

Université de Montréal

Modulation de la neurogénèse par la glycine

par

Sébastien côté

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître
en Pathologie et Biologie Cellulaire
option Système Nerveux

Août 2010

© Sébastien Côté 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Modulation de la neurogénèse par la glycine

Présenté par :
Sébastien Côté

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Julien Ghislain, président-rapporteur
Pierre Drapeau, directeur de recherche
Karl Fernandes, membre du jury

Résumé

Les vertébrés, du poisson à l'homme, possèdent un potentiel membranaire médié en partie par les ions chlorure (Cl⁻). L'une des premières formes d'activité neuronale lors du développement est la dépolarisation médiée par les ions chlorures extrudés par les canaux glycinergiques (GlyR) et GABAergiques. Cette dépolarisation est rendu possible grâce à l'expression retardée du co-transporteur d'ions chlorure et de potassium KCC2 lors du développement qui génère un gradient hyperpolarisant postnatalement chez les mammifères. Le rôle de cette dépolarisation précoce paradoxale durant le développement est inconnu. En injectant l'ARNm de KCC2 dans des embryons de poissons zébrés nouvellement fertilisé, nous avons devancé l'expression de ce co-transporteur rendant ainsi la glycine hyperpolarisante dans tous les neurones dès les premières phases du développement. Nous avons aussi ciblé le récepteur glycinergique directement en bloquant son activité et son expression à l'aide d'une drogue spécifique, la strychnine et d'un morpholino antisens (Knockdown). Dans les trois cas (KCC2, strychnine et GlyR KD), les perturbations de l'activité neuronale ont provoqués des erreurs dans la neurogenèse, en particulier une diminution du nombre d'interneurones sans avoir d'effets sur les motoneurones et les neurones sensoriels. De plus, en bloquant les canaux calciques activés à bas voltage dans le développement avec la drogue nifedipine, il y a des erreurs dans la neurogénèse semblables à celles remarquées dans les trois conditions précédentes. Nous concluons que la dépolarisation précoce par la glycine permet l'entrée du calcium et l'activation de la neurogénèse chez les interneurones.

Mots-clés : KCC2, Récepteur glycinergique, Neurogénèse, Calcium, Chlore, Poisson zébré

Abstract

Vertebrates, from fish to man, have a membrane potential mediated in part by chloride ions (Cl⁻). One of the first neuronal activity during development of the zebrafish spinal cord is cell depolarisation mediated by chloride extrusion via glycinergic receptors (GlyRs) and GABAergic receptors. This depolarisation is due to the absence of chloride-potassium cotransport channel KCC2, whose expression comes later in development, creating a hyperpolarising gradient. The role of this paradoxal depolarisation period during early stages of development is still unknown. By injecting KCC2 mRNA in newly fertilised zebrafish embryos, we expressed this co-transporter channel in neurons causing glycine to hyperpolarize in early phases of development. We also directly targeted the glycine receptor (GlyR) itself by blocking its activation with a chronic treatment of Strychnine, a specific drug, and by knocking down the expression of this receptor with an antisense morpholino injection. In those three conditions (KCC2, Strychnine and GlyR KD), perturbation of neuronal activity provoked major defects in neurogenesis, particularly in development of interneurons, without affecting other types of cells like motoneurons and sensory neurons. In addition, blocking low-voltage activated calcium channels with nifedipine provoked similar phenotypes. We conclude that the early glycine-mediated depolarisation allow calcium entry, thus activating certain aspects of interneurons neurogenesis.

Keywords : KCC2, Glycinergic receptor, Neurogenesis, Calcium, Chlore, Zebrafish

Table des matières

Introduction	1
Moelle épinière du poisson zébré.....	2
Génétique	4
Activité et KCC2.....	10
Glycine	17
Calcium	19
But.....	20
Résultats	21
L'expression précoce de hKCC2, perturbe le développement neuronal.....	22
La diminution de l'activité glycinergique par blocage pharmaceutique, ou l'atténuation de l'expression de ce récepteur perturbe le développement neuronal.....	27
Discussion	38
Matériel et Méthodes	50
Animaux.....	50
Injections.....	50
Application chronique de drogues	52
Immunohistochimie	52
Statistiques	53
Microscopie confocale.....	54
Conclusion	55
Annexes.....	56

Liste des tableaux

Tableau I. Statistiques de la Figure 5.....	P.53
Tableau II. Statistiques de la Figure 6 et de la Figure 10.....	P.53
Tableau III. Statistiques de la Figure 7.....	P.54
Tableau IV. Statistiques de la Figure 11.....	P.54
Tableau V. Statistiques de la Figure 12.....	P.55

Liste des figures

Figure 1. Code transcriptionnel basé sur les facteurs de transcription contenant un domaine homéoboîte, spécifiant les domaines progéniteurs dans le tube neural ventral.....	P.7
Figure 2. Schéma représentant les principaux interneurons de la moelle épinière du poisson zébré et un schéma simplifié du circuit locomoteur chez l'embryon du poisson zébré.....	P.9
Figure 3. Concentration ionique CL ⁻ durant le développement de la moelle épinière et effet de celui-ci sur la réponse électrique du GABA et de la glycine.....	P.12
Figure 4. Absence d'expression de KCC2 dans les neurones de la larve du poisson zébré et surespression de KCC2-GFP dans la moelle épinière par injection de l'ARNm.....	P.14
Figure 5. Immunohistochimie des interneurons de poissons sauvage et de poisson injectés avec l'ARNm de KCC2.....	P.24
Figure 6. Immunohistochimie des autres neurones constituant la moelle épinière de poissons sauvage et de poisson injectés avec l'ARNm de KCC2.....	P.25
Figure 7. Immunohistochimie de HU et PH3 de la moelle épinière de larves de poissons zébrés sauvages et injectés de l'ARNm de KCC2 à deux jours post-fertilisation.....	P.26
Figure 8. RT-PCR GlyR.....	P.27

Figure 9. Immunohistochimie des interneurons de poissons sauvage et de poisson injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique.....	P.28
Figure 10. Immunohistochimie des autres neurones constituant la moelle épinière de poissons sauvage et de poisson injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique.....	P.30
Figure 11. Immunohistochimie de HU et PH3 de la moelle épinière de larves de poissons zébrés sauvages et injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique, dans le temps.....	P.32
Figure 12. Immunohistochimie des poisson <i>bandoneon</i> et de poissons sauvage traité avec la bicuculine.....	P.35
Figure 13 : Décompte cellulaire des poissons de la lignée [evx:GFP] sous conditions expérimentales impliquant la Nifédipine, un bloqueur des canaux calcique de type-L.....	P.37
Figure 14 : Modèle impliquant différents rôles de la Glycine pendant la neurogénèse.....	P.43

"The only essential quality of a thesis is that it be finished."

Ronald Gray

*"L'histoire est utile non pour y lire le passé,
mais pour y lire l'avenir. " De Lorimier 1839*

*"Always do sober what you said you'd do drunk. That will teach you to
keep your mouth shut. " Ernest Hemingway*

Remerciements

J'aimerais premièrement remercier mon superviseur Dr. Pierre Drapeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en 2008. Tu as non seulement été un modèle de patience, de professionnalisme et de rigueur scientifique, mais aussi un modèle de vie pour moi. Tes conseils et tes idées ont toujours été des plus productives et des plus intéressantes pour mon cheminement dans ton laboratoire. Tu as su me montrer la voie et en même temps laisser libre recourt à mes idées et à ma créativité, ce qui s'est avéré une très bonne chose pour mon projet. Merci à Dr. St- Amant pour m'avoir laissé travailler physiquement et mentalement dans son laboratoire et aussi pour toutes ces excellentes discussions et critiques constructives sur mes expériences et mes méthodes d'analyses. J'en garderai un esprit critique plus développé essentiel à une carrière scientifique prolifique. Merci au Dr. Edna Brustein pour avoir participé activement à ce travail ainsi que pour m'avoir enseigné les rudiments de la microscopie confocale de façon patiente et dévouée. Merci à Meijiang Liao pour m'avoir aidé avec la biologie moléculaire et autres aspects techniques de la vie de laboratoire de tous les jours. Merci au Dr. Sean E. Low pour toutes ses suggestions et commentaires sur mon projet ainsi que sur la vie en général. Voyager avec Dr. Low fût une expérience hors du commun et je le remercie pour m'avoir transmis un peu de sa faculté innée à se poser les bonnes questions. Merci à Mathieu Lachance pour de belles leçons de résolutions de problèmes ainsi que pour sa joie de vivre infinie. Merci à mes collègues étudiants, en particulier Joel, Fred, Laura, Edor, Gary et Mathieu "Coyote" Simard pour leurs supports, leurs encouragements et parfois leurs facultés de dissuasions. Leurs présences actives dans ma vie ces deux dernières années ont été essentielles à ma santé mentale. Un énorme remerciement à ma famille qui a toujours été présente, qui m'a aidé, tant financièrement qu'émotivement, tout au long de mon cheminement académique et qui m'a transmis ces valeurs qui sont si importantes à mes yeux. Un merci tout spécial à mon amoureuse Fanny que j'ai rencontré un peu avant l'écriture de ce mémoire. Merci de tes encouragements, de ta patience et simplement merci d'être présente dans ma vie. Je t'aime.

Introduction

Depuis fort longtemps, le développement du système nerveux a grandement intéressé les scientifiques. L'apparition et la dissection des étapes du développement de réseaux complexes cellulaires, qui mènent à des comportements, sont des phénomènes fascinants, mais l'étude de ceux-ci est une tâche très compliquée et plusieurs aspects essentiels à ces phénomènes restent toujours incompris. On sait maintenant que l'émergence de mouvements coordonnés locomoteurs dans les vertébrés provient d'une interaction dynamique entre un programme central, appelé 'central pattern generator' (ou CPG) et d'une réponse rétroactive provenant du tronc cérébral et du cerveau. Le CPG est simplement un réseau neuronal indépendant qui peut générer des rythmes d'activité sans aucun apport extérieur qui se trouve généralement dans la moelle épinière et est essentiel à la production de commandes périodiques (Kiehn et al 2008). L'établissement de connexions sélectives entre plusieurs populations de neurones présents dans la moelle épinière et dans le système nerveux est donc primordial. L'assemblage de ces circuits requiert le bon développement de plusieurs types cellulaires différents, ayant plusieurs fonctions différentes. Les motoneurones, les interneurones, les neurones sensoriels et les muscles sont tous nécessaires à l'apparition de comportements. La spécification de ces diverses populations neuronales est largement médiée par un réseau de facteurs de transcription qui opèrent dans les cellules progénitrices et post-mitotiques. (Jessell 2000). La régulation de ces facteurs est un phénomène qui se doit d'être énormément synchronisé et régulé dans le temps puisque, par exemple, l'interaction entre deux facteurs de transcription seulement, peut procurer un destin cellulaire défini (voir figure 1 et figure 2).

Moelle épinière du poisson zébré

Le poisson zébré est un modèle idéal pour l'étude du développement du système nerveux. Les embryons de cet organisme sont transparents et donc sa moelle épinière est facilement observable en imagerie. C'est un organisme se développant extrêmement rapidement. Par exemple, le premier jour de développement des poissons zébrés correspond au premier trimestre chez les mammifères, ce modèle est donc très utile aux recherches développementales. De plus, une paire de poissons zébrés adultes peut donner plus d'une centaine d'œufs par croisement ce qui rend les manipulations génétiques à grande échelle possibles. Aussi, son développement se produit dans un environnement aquatique extérieur, ce qui permet des manipulations *in vivo* dès les premières phases de développement par des méthodes non invasives. De plus, les embryons peuvent se développer environs une semaine et ce, malgré être porteur de mutations létales, ce qui est un net avantage pour l'étude de gènes importants dans le développement. Son génome séquencé permet aussi des études d'homologie génétique et rend le travail des biologistes moléculaire plus facile. Le fait que la blastula est accessible de par le vitellus permet des manipulations génétiques simplement en injectant des molécules d'ARN ou d'ADN (Drapeau et al 2002). De plus, le développement de différents types de neurones a été bien caractérisé. Après la fermeture du tube neural, les neurones se différencient, des axones et dendrites vont commencer à croître et à former des synapses. Les neurones composant le système nerveux naissent durant deux phases distinctes de neurogénèse. Les neurones primaires sont présents en petits nombres et ont normalement un corps cellulaire plus large et un grand cône de croissance avec un grand champ d'innervation. Ces neurones comprennent les neurones sensoriels primaires, les motoneurones, les interneurones, les cellules sensorielles de la lignée trigeminale et celles composant la ligne latérale.

À 48 hrs de développement, la larve du poisson zébré a déjà acquis des comportements stéréotypés comme la nage (Kimmel et al 1974). Dépendamment de leurs âges, les embryons montrent en effet au moins trois comportements moteurs qui reflètent le développement normal du circuit responsable de la nage. En premier viennent les

contractions spontanées puis la réponse au toucher et finalement la nage (Drapeau et al 2002). Les contractions spontanées sont dues au couplage électronique par les "gap" jonctions. Ceci est une forme d'activité précédant les oscillations calciques et la période de synaptogénèse intense (O'Donovan 1999). Cette forme d'activité serait utile à l'assemblage fonctionnel de circuits neuronaux avant l'apparition de stimulus postnatals (Feller 1999; Kandler & Katz 1998; Katz 1993). Ce phénomène repose donc sur la formation de circuit primitif composé principalement de motoneurones primaire. Pour ce qui est de la réponse au toucher, elle nécessite une réponse du rhombencéphale et possiblement une activation de neurones sensoriels Rohon-Beard. Les RBs sont des neurones mécanosensibles, retrouvés dans la partie la plus dorsale de la moelle épinière en développement. Ces neurones primaires sensoriels, qui peuvent être jusqu'à quatre par somites (division du tronc), sont les premiers à projeter leurs axones dans le "dorsal longitudinal fasciculus" (DLF) vers 15 hrs post fertilisation. Ils meurent cependant vers 5 jours post fertilisation de par la mort cellulaire programmée et ils sont remplacés par les neurones de la racine ventrale (Reyes et al 2004).

Dans l'embryon du poisson zébré, les premiers interneurones à projeter des axones sont les "commissural primary ascending" neurones (CoPA) et les "dorsal longitudinal ascending neurons" (DoLA) innervent le DLF. Les neurones "ventral longitudinal descending" (VeLD) et les neurones "commissural bifurcating" (CoB) développent leurs axones pour innervent le "ventral longitudinal fasciculus" (VLF). Les neurones "commissural ascending secondary" (CoSA), les "circumferential ascending" (CiA) et les "circumferential descending" (CiD) qui innervent tous le DLF, initient leur axonogénèse vers 22 Hpf (Bernhardt et al 1990; Hale et al 2001). Dans des régions plus rostrales, des neurones ipsilatérales (IC) avec projections caudales sont aussi présents (Bernhardt et al 1990; Brustein et al 2003). Les DoLA, CiD et CiA sont seulement retrouvés dans l'embryon (Drapeau et al 2002). Étant donné que la nage apparaît vers les 27 heures post fertilisation, le CPG est complètement formé à cette étape.

Génétique

Comme vu précédemment, les circuits neuronaux se doivent d'être assemblés avec beaucoup de précision durant le développement embryonnaire. Dans le système nerveux central du vertébré, ce programme développemental débute avec la différenciation de classes de neurones distinctes, issues de cellules progénitrices localisées à des positions définies du tube neural. Le mécanisme qui spécifie l'identité de ces cellules a été examiné de près et ce, dans différentes régions du système nerveux chez plusieurs organismes. Le décodage récent de mécanismes génétiques qui sous-tendent la détermination de ces cellules neuronales a révélé ce qu'on appelle maintenant le code transcriptionnel (Jessell 2000). Ce code contrôle la spécification, et du coup le développement du destin cellulaire de plusieurs sous-classes de cellules, en contrôlant l'identité postmitotique des progéniteurs neuronaux (Briscoe et al 2000; Lupo et al 2006). Ce code transcriptionnel a largement été découvert grâce au modèle murin et aviaire, mais il a été démontré que les mêmes mécanismes régissaient ce phénomène chez l'embryon du poisson zébré (Chen et al 2001; Guner & Karlstrom 2007). Deux systèmes de signalisation suivant les axes du tube neural ont été identifiés. Il s'agit de la signalisation dorsoventrale et rostrocaudale. La position des cellules progénitrices le long de ces deux axes semble influencer leurs destins de par leurs expositions à différentes concentrations de facteurs de détermination. L'axe rostrocaudal est important pour diviser les différentes parties du système nerveux soient le télencéphale, le mésencéphale le tronc cérébral et la moelle épinière. Je parlerai plus en détail de la spécification de l'axe dorsoventrale puisque mes études portent sur le développement de la moelle épinière seulement. Cet axe est reconnu pour contrôler la diversité de la population neuronale. Aussi les neurones en développement sont aussi reconnus pour interagir entre eux pour influencer leurs développements positivement ou négativement (Schoenherr et al 1996). Un bon exemple de ce phénomène est l'inhibition latérale dont je parlerai un peu plus loin.

Le tube neural est un simple feuillet cellulaire enroulé, qui au début ne comporte qu'une couche de cellule. Les cellules du côté le plus ventral formeront les motoneurones et une sous-classe d'interneurone (V3), les cellules latérales formeront divers interneurones (V0,V1,V2). Les différents types cellulaires peuvent être distingués avant leur différenciation morphologique par les protéines qu'ils produisent. Le gradient de concentration de la protéine sonic hedgehog (Shh) (équivalent de hedgehog chez la drosophile) détermine le destin cellulaire des cellules composant le tube neural (Shirasaki & Pfaff 2002). Ces cellules occupent diverses positions suivant cet ordre qu'on peut voir à la figure 1. V3, MN, V2, V1, V0. Au court du développement, Shh est exprimé d'abord en taux élevé dans le notochorde, une structure mésodermique en contact direct avec la région ventrale du tube neural. Après induction, les cellules de la plaque du plancher du tube neural produisent à leurs tours Shh formant un centre de signalisation Shh dans cette région. Mais, Shh n'agit pas seulement comme activateur mais aussi en tant que morphogène (Ruiz i Altaba et al 2003). Ce type de molécule produit un signal d'induction qui agit selon différentes concentrations. Ces différents milieux à différentes concentrations semblent être seulement dus à la vitesse de diffusion de la molécule de la plaque ventrale vers la plaque dorsale. Des anticorps antiShh bloquent la formation des différentes cellules du tube neural ventral chez le poulet et ces types ne se forment pas chez les souris homozygotes pour des mutations du gène *Sonic hedgehog* (Tan et al 2006). Les destins cellulaires de la région dorsale du tube neural sont déterminés par les protéines BMP qui appartiennent à la famille du TGF β . Sur le plan de l'évolution, le système TGF β paraît être un régulateur ancien de la structuration dorsoventrale. Dans les embryons des vertébrés, les protéines BMP sécrétées par les cellules ectodermiques couvrant le côté dorsal du tube neural induisent la formation des neurones sensoriels à partir des cellules dorsales (Hammerschmidt et al 1996). Ainsi, les cellules dans le tube neural perçoivent de multiples signaux qui prennent origine dans des sites opposés de l'axe dorsoventral, et c'est la proportion respective des signaux des deux origines qui décidera du cours de la différenciation. Mais comment une simple molécule peut-elle exercer une influence aussi importante sur le développement du système nerveux ? La réponse semble être dans la façon dont cette molécule est détectée par les cellules. Cette voie de signalisation est

induite par la liaison de la protéine avec un récepteur hétérodimérique complexe. Shh semble se lier avec une sous-unité de ce récepteur nommé Patched et cette sous-unité enlève la répression qu'elle exerçait sur une autre sous-unité nommée Smoothened. L'activité de Smoothened génère alors un signal intracellulaire qui régule une panoplie de protéines kinases et des facteurs de transcription nommés Gli et d'autres facteurs de transcription à doigts de zinc (Aza-Blanc et al 1997). Tout les facteurs de transcription identifiés à ce jour et impliqués dans ce phénomène ont des domaines homéoboîte (Briscoe et al 2000), à l'exception de Olig2 qui est un bHLH (Mizuguchi et al 2001). Le domaine homéoboîte est un motif ayant une structure composée de 60 acides aminés connu pour se lier spécifiquement à l'ADN et réguler l'expression de gènes dans le développement (Chuang et al 1991). Des études chez la drosophile ont révélées que lorsque des gènes *hox* (*homeobox*), qui ont tous des domaines homéoboîtes, des altérations morphogéniques sévères sont observés dans plusieurs tissus. Il a donc été conclu que les protéines contenant des domaines homéoboîte pouvaient affecter une panoplie de gènes important pour des processus de différenciation durant le développement (Graba et al 1997). Les protéines contenant un domaine homéoboîte et qui sont impliqué dans le développement de la moelle épinière sont divisées en deux classes. La classe 1 est caractérisée par une inactivation de leur expression par Shh et les protéines de la classe 2 requièrent celui-ci pour que leur expression soit induits (Briscoe et al 2000). Suite à l'établissement du patron d'expression des facteurs de transcription de la classe 1 (*Pax7*, *Dbx1*, *Dbx2*, *Irx3* and *Pax6*) et 2 (*Nkx6.1*, *Nkx6.2*, *Nkx2.2*, *Olig2*), la répression réciproque de ces deux classes formera des barrières très fines et bien définies afin de caractériser cinq domaines progéniteurs ventraux (*p0-p4* et *MN*). Ces domaines contenant des cellules progénitrices exprimant ces facteurs donneront, de façons post mitotique, les sous-classes d'interneurones *V0*, *V1*, *V2*, *V3* et *MN*, qui eux aussi exprimeront d'autres facteurs de transcriptions spécifiques comme *Evx1/2*, *En1*, *Chx10*, and *Sim1* respectivement, et *Isl1/2* and *HB9* pour les *MN* (Albright et al 2000; Briscoe et al 2000; Ericson et al 1997; Lee et al 2000; Pierani et al 1999; Tsang et al 2000; Tsuchida et al 1994; Wilson et al 2000). Un certain nombre de ces facteurs postmitotiques, comme par exemple *Evx1* ont même été démontrés comme étant

essentiel à la maintenance du destin cellulaire durant le développement (Moran-Rivard et al 2001).

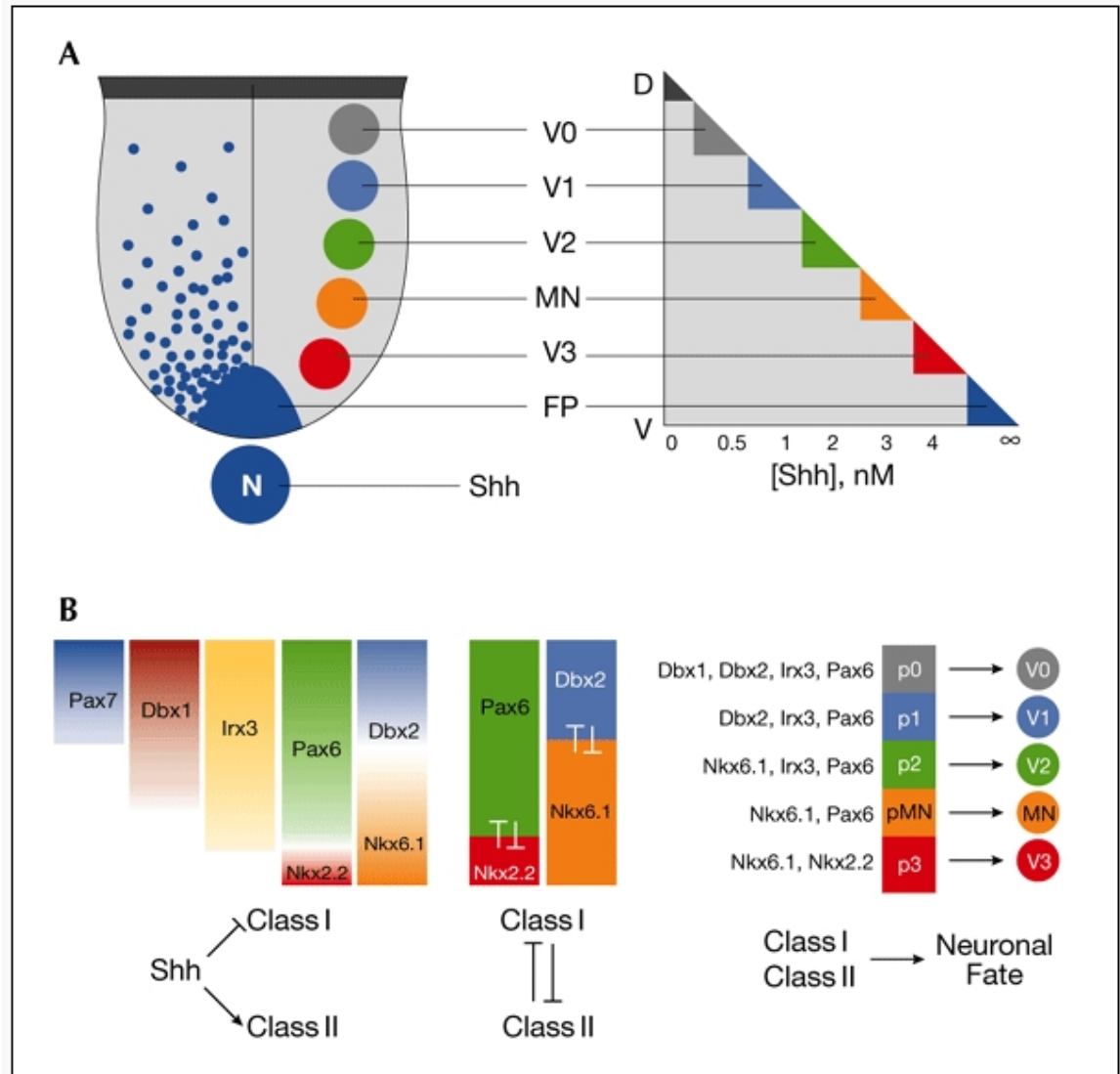


Figure 1. Code transcriptionnel basé sur les facteurs de transcription contenant un domaine homéoboîte, spécifiant les domaines progéniteurs dans le tube neural ventral. Un gradient de la protéine Sonic hedgehog (Shh) établit des classes de progéniteurs distinctes par régulation de l'expression de facteurs de transcription. Ces facteurs sont divisés soit en classe 1 ou en classe 2, dépendamment de leurs activation ou répression par

la signalisation de Shh. Chaque domaine progéniteurs donnent naissance à une classe de neurones post-mitotique spécifique. (A) Cinq sous-types neuronaux ventraux sont issus d'autant de domaines progéniteurs dans la zone ventriculaire de la moelle épinière. Progressivement, les domaines progéniteurs dorsaux sont exposés à des concentrations décroissantes de Shh. (B) Le gradient de concentration de Shh régule l'expression de facteurs de transcription dans les cellules progéniteurs ventrales. Shh réprime les gènes de classe 1 et induit l'expression de ceux de la classe 2 à une concentration différente. Une répression réciproque entre ces deux classes, qui partagent une frontière commune, permet de raffiner ces frontières. L'expression combinatoire de ces protéines contenant des homéodomaines détermine le sous-types neuronal issu de chaque domaine. D, dorsal; Dbx, "developing brain homeobox" transcription factor; FP, "floor plate"; Irx, "iroquois homeodomain protein"; MN, "motor neuron"; N, "notochord"; Nkx, Nkx "homeodomain protein"; Pax, "Paired homeodomain protein"; V, ventral; V0–V3, interneurons ventraux 0–3. (Figure adaptée de Briscoe 2003).

Dans une optique fonctionnelle simple, le modèle de circuit locomoteur implique des neurones glutamatergiques descendantes qui active les motoneurons pour produire une contraction musculaire. De plus, il y a une réponse inhibitrice des cellules commissurales qui projettent leurs axones de façon contralatérale pour prévenir une contraction de l'autre côté de l'animal via un signal glycinergique inhibiteur chez l'adulte, mais dépolarisant chez l'embryon grâce à l'expression graduelle du cotransporteur KCC2 (Brent & Drapeau 2002; Grillner 2003). Un schéma adapté de Lewis and Eisen et de Roberts, (figure 2) explique ce circuit simplifié et les cellules pouvant le composer.

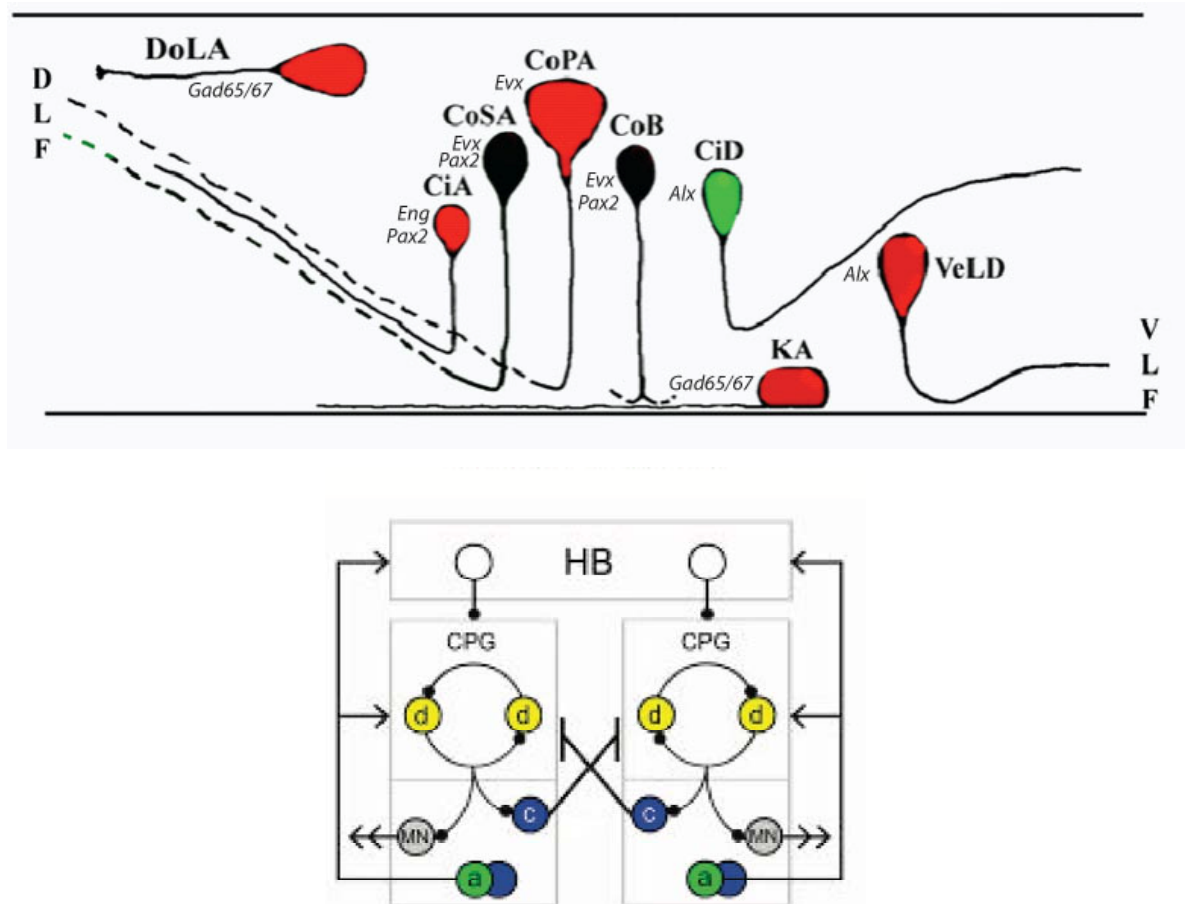


Figure 2. Schéma représentant les principaux interneurones de la moelle épinière du poisson zébré et un schéma simplifié du circuit locomoteur chez l'embryon du poisson zébré. (A) Neurones présents dans l'embryon du poisson zébré (20hpf) incluant dorsal longitudinal ascending (DoLA), ventral longitudinal descending (VeLD), commissural primary and secondary ascending (CoPA and CoSA). Les neurones venant plus tard dans le développement (22-23hpf) incluent les circumferential descending (CiD) ou ascending (CiA) et les commissural bifurcating (CoB) neurones. Le côté rostral est à gauche et le côté dorsal en haut. En Vert : les interneurones excitateurs. En rouge les neurones inhibiteurs. En noir : certaines sont excitateurs d'autres sont inhibiteurs. Les lignes pointillées représentent un croisement contralateral de la moelle épinière. DLF/VLF: dorsal or ventral longitudinal fasciculus. Les caractères en italiques représentent les marqueurs utilisés afin

de les repérer en immunohistochimie. Notons qu'il faut ajouter les neurones sensoriels, les neurones de soutiens et les motoneurones au schéma afin d'avoir la représentation de la totalité de la moelle épinière. **(B)** Des signaux descendants du rhombomère (hindbrain;HB) active le CPG des deux côtés de l'animal. Le CPG comprend des interneurones excitateurs descendant qui produisent un signal rythmique pour activer les motoneurones (MN en gris). Ils activent aussi les neurones commissuraux (C, en bleue), qui sont impliqués dans l'inhibition bilatérale du côté contralatéral. Les interneurones ascendants (a, en vert et bleue) donnent une information de réponse sensorielle au HB.

Activité et KCC2

Les acides aminés, incluant le glutamate, l'acide aspartique, l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et la glycine sont les neurotransmetteurs majeurs du système nerveux central. L'acide aspartique et le glutamate sont reconnus comme étant des neurotransmetteurs excitateurs tandis que la glycine et le GABA sont reconnus comme étant des inhibiteurs chez l'adulte. Les neurotransmetteurs excitateurs agissent au niveau des récepteurs post et pré-synaptiques, ce qui peut induire une entrée de calcium (Ca^{2+}) à l'intérieur de la cellule suite à l'augmentation de l'excitabilité du neurone. Au contraire, les neurotransmetteurs inhibiteurs empêchent cette entrée de Ca^{2+} en diminuant l'excitabilité du neurone. L'équilibre entre ces deux phénomènes se doit donc d'être très bien régulé sans quoi la base fonctionnelle des CPGs peut être compromise (Hinckley et al 2005; Pflieger & Dubuc 2000). Malgré que le GABA et la glycine soient communément appelés inhibiteurs, ils peuvent parfois provoquer une dépolarisation (Ganguly et al 2001). Cette action post-synaptique dépend de la concentration d'ions chlorure (Cl^-) intracellulaire du neurone puisque le récepteur glycinergique/GABAergique est un pore perméable au chlore, lorsque lié à son ligand. En effet, dans les neurones immatures, la concentration de chlore intracellulaire est élevée par comparaison aux neurones plus matures.

Cette différence de concentration dépend uniquement de la présence ou de l'absence de certains transporteurs ioniques à la surface membranaire. Le transporteur NKCC1 qui est responsable du transport des ions chlorures à l'intérieur de la cellule est présent dans les neurones immatures (Dzhala et al 2005; Ikeda et al 2003; Plotkin et al 1997). Il assume donc son rôle et augmente la concentration intracellulaire de chlore. Lorsque le GABA ou la glycine se lie à son récepteur, l'activation de celui-ci produit une extrusion des ions chlorures négatifs à l'extérieur de la cellule. Cette dépolarisation médiée par la sortie d'ion négatif semble être cruciale pour le développement du système nerveux (Ben-Ari 2002; Fiumelli & Woodin 2007; Reynolds et al 2008b). Il est logique de penser que ce phénomène puisse être d'une grande importance puisque dans les premières phases de développement, la transmission glutamatergique est inexistante de par l'absence de récepteur adéquat. Il semble donc que la dépolarisation médiée par la glycine et le GABA soit la seule à agir dans les phases précoces de développement du système nerveux. Ceci pourrait permettre à la cellule d'éviter tout excitotoxicité pouvant être causé par le glutamate dans une cellule neuronale peu différenciée.

Dans le développement, la modulation de cette concentration intracellulaire de Cl⁻ est spécifiquement contrôlée par la présence ou l'absence du cotransporteur neurone-spécifique KCC2 qui extrude des ions Cl⁻ et K⁺ à l'extérieur du neurone (Delpire & Mount 2002; Payne et al 2003; Rivera et al 2004; Stein et al 2004). Par l'apparition de ce cotransporteur, la concentration intracellulaire de chlore devient alors normale et ceci coïncide avec l'apparition de la fonction inhibitrice de ces neurotransmetteurs (Rivera et al 1999; Yamada et al 2004). Un schéma qui résume bien ce phénomène, adapté de Vinay 2008 (Vinay & Jean-Xavier 2008), est représenté à la figure 3.

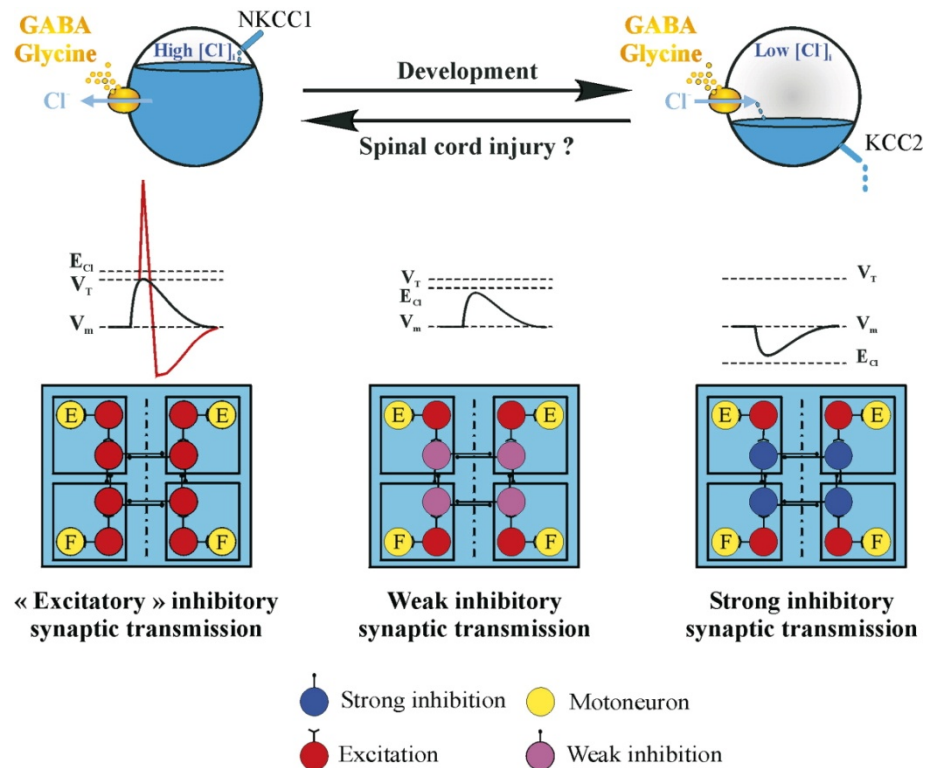


Figure 3. Concentration ionique Cl^- durant le développement de la moelle épinière et effet de celui-ci sur la réponse électrique du GABA et de la glycine. Les cotransporteurs de chlore sont responsables de la régulation de la concentration d'ions chlorure intracellulaire (Cl^-). Dans un neurone immature, la concentration des ions Cl^- est élevée de par l'accumulation de ceux-ci grâce à la présence du cotransporteur NKCC1. L'activation des récepteurs GABA et glycinergiques peut alors potentiellement amorcer un potentiel d'action. Conséquemment, les interneurons inhibiteurs ont maintenant un rôle potentiel d'excitateurs. Adapté de (Price et al 2005).

L'action excitatrice du GABA et de la glycine dans cette phase précoce et cruciale du développement reste encore inconnue. On sait cependant que cette étape semble être essentielle pour produire des changements synaptiques dépendantes, ce qui est nécessaire à la production de circuits neuronaux matures (Owens & Kriegstein 2002). On sait aussi que l'expression prématurée de KCC2, résultant en un phénomène

d'hyperpolarisation provoqué par la glycine, provoque des erreurs dans la neurogénèse ainsi qu'une mauvaise morphologie neuronale et une mauvaise formation de synapse (Akerman & Cline 2006; Cancedda et al 2007; Chudotvorova et al 2005; Reynolds et al 2008b). Aussi, ce signal dépolarisant semblerait moduler la migration neuronale (Bortone & Polleux 2009). L'expression graduelle de KCC2 semble aussi importante pour la maturation neuronale. La souris KO (knock-out) (Li et al 2007) présente des neurones ayant peu de synapses et des épines dendritiques allongées. Bref, la régulation de KCC2 semble contrôler des étapes importantes des phases précoces de développement de la signalisation inhibitrice, de la formation de synapse ainsi que de la production de réseaux neuronaux complexes fonctionnels. Déterminer comment le KCC2 régule ces processus est essentiel, car il a été montré qu'une diminution de ce transporteur est observée chez des patients épileptiques (Huberfeld et al 2007) et que la souris transgénique exprimant uniquement l'isoforme KCC2b a des crises épileptiques spontanées résultants en la mort de celle-ci (Woo et al 2002).

Le KCC2 appartient à la grande famille des cotransporteurs K^+-Cl^- . Cette famille comprend le KCC1, impliquée dans la régulation du volume cellulaire (Gillen et al 1996). Le KCC3 est exprimé dans le cœur, les muscles squelettiques, les reins, et le cerveau (Hiki et al 1999; Mount et al 1999; Race et al 1999) et le KCC4 est présent en abondance dans les reins et le cœur (Boettger et al 2002; Mount et al 1999). Ces transporteurs ont plusieurs caractéristiques en communs. Ils possèdent tous 12 domaines transmembranaires, un C-terminal cytosolique de 481 acides aminés hydrophobiques ainsi qu'un N-terminal de 102 acides aminés. Ce qui rend le KCC2 unique c'est qu'il est exprimé spécifiquement dans le système nerveux et son affinité pour le chlore et le potassium est très élevé (Song et al 2002). Cette expression localisée semble être due à un élément atténuateur sélectif non neuronal de 21 paires de bases localisé dans l'intron 1, qui préviendrait l'expression, lorsque liée à un facteur de transcription exprimé dans les cellules non neuronales (Karadsheh & Delpire 2001). Comme mentionné précédemment, l'expression du KCC2 est très basse dans les premières étapes de développement puis son niveau augmente graduellement dans le développement et suit le patron de maturation neuronal caudal –

rostral (Mikawa et al 2002; Rivera et al 2002; Stein et al 2004; Wang et al 2002) (figure 4A). De plus, lorsqu'injecté dans les ovocytes de poissons zébrés, l'ARNm de KCC2 couplé à la GFP est exprimé et le transporteur se localise à la membrane cellulaire des cellules spinales (figure 4B).

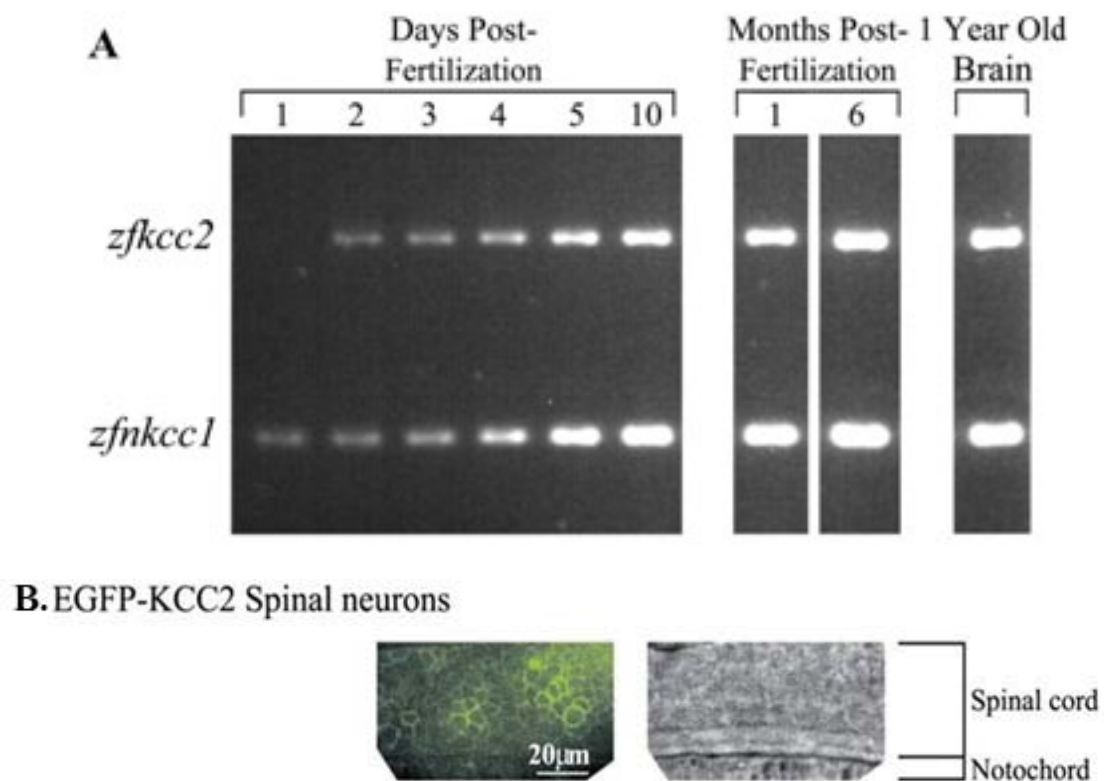


Figure 4. Absence d'expression de KCC2 dans les neurones de la larve du poisson zébré et surexpression de KCC2-GFP dans la moelle épinière par injection de l'ARNm. **A.** RT-PCR utilisant des extraits d'ARN total de poisson zébré de 1 à 5 jours post-fertilisation, 1 et 6 mois post-fertilisation et le cerveau d'un poisson de 1 an. La bande du haut représente l'ARNm de KCC2 (778pb) et la bande du bas représente l'ARNm de nKCC1 (413 pb). **B.** Lorsqu'injecté dans les œufs, l'ARN de KCC2 couplé à la GFP est bien exprimé et le transporteur se localise à la membrane plasmique des cellules spinales. (figure adapté de Reynolds et al 2008)

Donc, en injectant l'ARNm humain de KCC2 dans les ovocytes de poissons zébrés, Reynolds et al ont montré que le transporteur était bel et bien localisé à la membrane et qu'il était fonctionnel de par les propriétés électriques des cellules l'exprimant (Reynolds et al 2008a).

L'inhibition de la glycine et du GABA induite par l'expression du KCC2 arrive à une période cruciale de formation de circuits neuronaux, mais elle est présente bien avant que l'excitation provenant de la transmission glutamatergique n'ait besoin d'être contre carré par l'inhibition pour prévenir les crises d'activité potentiellement dangereuse à la survie de la cellule (Ben-Ari 2002). Ce qui déclenche l'expression de KCC2 est encore inconnu. Quelques études ont mis en perspective l'implication d'un facteur neurotrophique comme le BDNF (Aguado et al 2003) qui agirait en tant qu'inducteur de l'expression de KCC2 de par son action trophique ou en mimant l'activité excessive associée à certaines pathologies. Les souris n'ayant pas le récepteur BDNF TrkB ont démontré une réduction du cotransporteur KCC2 dans leurs cellules pyramidales (Carmona et al 2006). D'autres chercheurs ont aussi établi un lien entre l'action du GABA à son récepteur et l'expression de KCC2. En effet, il semblerait que le blocage chronique des récepteurs GABAergiques ralentirait l'expression de KCC2 et à l'inverse, l'augmentation de l'activation accélérerait ce processus (Ganguly et al 2001). Ils suggèrent donc que le GABA agit comme un facteur trophique autolimitant en agissant sur les niveaux de l'ARNm de KCC2. Toutefois, d'autres auteurs ont démontré sur des cellules en culture et avec l'aide d'antagonistes du récepteur GABAergique, que ces corrélations étaient non fondées (Ludwig et al 2003; Titz et al 2003). Les fondements du contrôle de l'expression du KCC2 sont donc encore débattus dans la littérature.

Des études conclusives chez des souris "knock-out" pour ce gène ont démontré sa nécessité à la survie et au bon développement du système nerveux. L'excision de ce gène provoque un phénotype moteur sévère et une mort précoce due à un manque respiratoire

(Hubner et al 2001). Les motoneurones de ces souris montrent aussi une hyperexcitabilité et se dépolarisent en présence de glycine et de GABA ce qui est consistant avec le rôle cotransporteur ionique et de mainteneur de gradient chlorique intracellulaire de KCC2. Les souris n'ayant que peu de KCC2 ont tendance à avoir des crises épileptiques et des pertes d'interneurones. Aucune mutation n'a été décrite dans les cas familiaux d'épilepsie, probablement car les fœtus ayant une mutation meurent *in utero* tout comme les souris KO (Woo et al 2002).

Le GABA et la glycine sont présents tôt dans le système nerveux, longtemps avant que les signaux synaptiques soient établis. Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur à action rapide dans le néocortex chez l'adulte (Connors et al 1988; Krnjevic & Schwartz 1967). C'est aussi un des neurotransmetteurs les plus abondants dans la neurogénèse chez le mammifère (Cicirata et al 1991; Miranda-Contreras et al 1999). De nombreuses études *in vitro* sur diverses préparations ont démontré que ces neurotransmetteurs pourraient agir comme facteurs trophiques, et ce, à plusieurs stades de développement incluant la prolifération des cellules progénitrices, la migration neuronale, la croissance des neurites et la formation des synapses (Represa & Ben-Ari 2005). Ces événements sont souvent régulés par des signaux chimiques extrinsèques dont les neurotransmetteurs font parties (Nguyen et al 2001; Owens & Kriegstein 2002). En fait, les neurotransmetteurs sont des candidats de premier ordre pour influencer le développement du SNC puisqu'ils entourent ces cellules durant leurs périodes de maturation (Cicirata et al 1991; Miranda-Contreras et al 1998; Miranda-Contreras et al 2000). Cette affirmation se concrétise lorsqu'on sait qu'il y a présence de canaux ioniques activées par des ligands à la surface des cellules progénitrices neuronales et ce, avant la formation des synapses (Belachew et al 1998; Flint et al 1998; Ma et al 2000; Maric et al 2000; Saha et al 1997). On sait aussi qu'il existe des cellules souches neuronales dans le cerveau adulte et dans la moelle épinière (Gage 2000). La modulation pharmacologique de la concentration de neurotransmetteur ou de leurs actions à la membrane de ces cellules pourrait être de bonne cible pour tenter de contrôler le développement neuronal ou de pallier à des manques ou des maladies du développement. Cependant, dans l'organisme utilisé dans mon projet : la

larve du poisson zébré, la glycine, en opposition au GABA, contribue de façon significative à l'activité synaptique durant les épisodes de nage (Buss & Drapeau 2001). De plus, des potentiels postsynaptiques excitatoire (EPSP) spontanés glycinergique sont fréquents chez la larve contrairement à ceux GABAergique qui sont très rare dans les premières phases développementales (Ali et al 2000; Hatta et al 2001; Legendre & Korn 1994; Triller et al 1997). Je me suis donc concentré sur l'effet de la glycine dans le développement du système nerveux de cet organisme.

Glycine

Les récepteurs glycinergiques sont des pentamères formés de sous-unités transmembranaires intégrales glycosylés. Quatre sous-unités alpha ($\alpha 1$ $\alpha 2$ $\alpha 3$ et $\alpha 4$) et une sous-unité bêta forment ces pentamères (Kuhse et al 1990). Ils sont généralement composés de deux sous-unités beta et de 2 sous-unités alpha. La glycine se lie préférentiellement aux sous-unités alpha, qui sont responsables de l'ouverture du pore. Normalement, 2 molécules de glycine sont nécessaires pour l'activation du pore. La partie extracellulaire qui se lie au ligand est formée de 4 domaines hydrophobiques transmembranaires appelés M1, M2, M3 et M4. Le domaine M2 est reconnu comme étant le plus important puisqu'il forme la paroi du pore (Armstrong & Hille 1998). L'hétérogénéité de la composition en sous-unité du récepteur vient surtout de la combinaison de celles-ci ainsi que l'épissage alternatif du gène codant pour la sous-unité alpha. Des mutations faux-sens dans le gène codant pour la sous-unité alpha GLRA1 ont été corrélées avec un désordre neurologique appelé hyperexplexie héréditaire (Tohier et al 1991). Cette maladie se caractérise par des raideurs généralisées apparaissant immédiatement à la naissance et disparaissant spontanément à la première année de vie, d'un réflexe de tressaillement (réflexe du nouveau-né consistant en un sursaut général du corps avec écartement des bras et renversement de la tête en arrière) provoqué par un bruit et suivi d'une période prolongée de raideur après le réflexe. L'intelligence de la personne atteinte est cependant conservée. Des cas de morts subites ont été rapportés. Par

contre, aucune mutation de GlyR alpha2 n'a été rapportée dans la littérature (tout comme KCC2), ce qui peut dénoter un rôle essentiel embryonnaire.

Les récepteurs glycinergiques sont des récepteurs faisant partie de la famille des récepteurs nicotiques activés par un ligand. Ils sont aussi caractérisés par leur sensibilité à la strychnine, une drogue qui était surtout utilisée comme stimulant du SNC, ou laxatif en médecine du début du 20^e siècle. Dû à sa toxicité, son utilisation s'est arrêtée lorsque des substances alternatives ont été découvertes. C'est une des substances les plus amères qu'il existe. Elle peut même être détectée par la langue humaine à moins de 1ppm (Le Novere & Changeux 1999). Chez l'adulte les GlyRs sont majoritairement situés dans la membrane postsynaptiques et reliés aux microtubules par une protéine de 93 kDa, la gephyrin (Feng et al 1998; Kneussel & Betz 2000; Langosch et al 1988). La sous-unité beta est essentielle à la localisation du récepteur à la membrane synaptique puisque c'est elle qui lie la géphyrin (Meyer et al 1995). Notons que les sous-unités alpha restent actives même si non-localisées aux synapses.

Des études *in situ* (Malosio et al 1991) et *in vitro* (Tapia & Aguayo 1998; Withers & St John 1997) sur les rongeurs ont démontré que les récepteurs glycinergiques étaient exprimés par les cellules neurales progénitrices dans le cortex en développement ainsi que dans la moelle épinière. Aussi, il a été démontré en 1969 que la glycine était retrouvée en grande quantité dans la moelle épinière comparativement au cortex suggérant qu'un autre ligand endogène pourrait stimuler les récepteurs glycinergiques durant la corticogénèse (Aprison et al 1969). Un candidat potentiel pouvant jouer ce rôle est la taurine (Schmieden et al 1992). En effet, la taurine est exprimée en grande quantité dans le cortex en développement et son expression est de beaucoup diminuée de façon postnatale. Aussi, sa synthèse est de beaucoup supérieure dans le cortex que dans la moelle épinière ce qui est exactement à l'opposée de la synthèse de glycine (Agrawal et al 1971). Le rôle neurotransmetteur de la taurine, agissant sur les récepteurs glycinergiques dans le cortex en développement, pourrait expliquer les résultats des expériences de privation alimentaire de taurine chez la chatte durant une grossesse menant à des erreurs de neurogénèse corticale

chez les chattons (Palackal et al 1986). D'autres études ont aussi suggéré que la signalisation par le récepteur glycinergique pourrait jouer un rôle dans l'établissement de synapses puisque l'expression maximum de la taurine et de la glycine arrive exactement en synchronisation avec le début de la synaptogénèse (Flint et al 1998). D'autres études *in vivo* et *in vitro* s'attardant aux possibles effets trophiques de la glycine dans le développement du système nerveux central ont suggéré un rôle de la transmission glycinergique dans la régulation de la croissance de processus post-synaptiques chez la gerboise (Kotak & Sanes 1996; Sanes & Chokshi 1992; Sanes & Hafidi 1996). Aussi l'activation de ces récepteurs *in vitro* augmente le nombre de neurites primaires et la longueur de ceux-ci, dans les neurones de la moelle de souris (Tapia et al 2000). Des études ont aussi été effectuées sur des cellules de Purkinje de rat *in vitro*, démontrant que la glycine et la L-sérine, un agoniste de la glycine relâchée par la glie, agissent sur ces cellules pour promouvoir leurs survies, leurs denritogénèse et leurs développements électrophysiologiques (Furuya et al 2000). Notons que les concentrations utilisées étaient très près de celles retrouvées *in vivo* chez le cerveau du rat en développement, suggérant un possible rôle *in vivo* de ces acides aminés.

Calcium

Dans le cerveau immature, il a été démontré que la dépolarisation causée par le GABA et la glycine pouvait induire une bouffée intracellulaire de calcium via des canaux calciques dépendants du voltage. Aussi, ces dépolarisations peuvent être assez grands pour pouvoir activer les récepteurs NMDA en enlevant l'ions Mg^{2+} qui le bloque normalement. Ces bouffées peuvent ensuite mener à une activation des mécanismes de seconds messagers dépendant du calcium et mené à l'expression spécifique de certains gènes (Andjus et al 1996; Belachew et al 2000; Devau 2000; Frech et al 1999; Fucile et al 2000; Ito & Cherubini 1991; Leinekugel et al 1995; Manent et al 2005; Marchioro et al 1996; Owens et al 1996; Reichling et al 1994; Weaver et al 1998). La surexpression de KCC2 dans des cultures de neurones corticaux et hypocampaux a démontré que ces manipulations ont rendu la transmission GABAergique et glycinergique hyperpolarisante ce qui a inhibé les

augmentations soudaines d'ions calciques à l'intérieur de ces cellules (Chudotvorova et al 2005; Fiumelli et al 2005; Lee et al 2005). Lors de ces études, l'effets sur la neurogénèse n'a pas été étudié car dans plusieurs cas, le KCC2 fût exprimé dans une population restreint de précurseur comparativement aux études chez le poisson zébré ou l'expression était globalement altéré du à l'accessibilité de son embryon.

But

L'objectif de mon travail était de déterminer le rôle de la dépolarisation et de l'entrée de calcium subséquente provoqué par la glycine dans la neurogénèse. Plus en détail, le premier objectif visé était de déterminer si le phénomène observé au préalable était spécifique pour certains sous-types de neurones ou si tout les interneurones étaient affectées lors de disruption de la signalisation glycinergique.

Résultats

Pour évaluer le rôle de la neurotransmission glycinergique dans le développement du système nerveux du poisson zébré, j'ai eu recours à plusieurs méthodes décrites dans la section matériel et méthode. Dans cette section-ci, je montrerai les immunohistochimies effectuées durant la première phase de mon projet et résultant de plusieurs traitements sur les larves de poissons zébrés. Je comparerai aussi les résultats et démontrerai que la moelle épinière est modifiée dans mes conditions expérimentales. De plus, une analyse de la moelle épinière d'un poisson mutant pour la sous-unité beta du récepteur glycinergique sera montrée.

L'expression précoce de hKCC2, perturbe le développement neuronal.

Tout au long de mon projet, j'ai utilisé des techniques de microinjections d'ARNm (pour la surexpression de KCC2) dans les embryons de poissons zébré, au stade une cellule (Reynolds et al 2008b) pour investiguer le rôle du gradient de chlorure dans les phases précoces du développement embryonnaire d'un vertébré. Afin de voir l'effet de mes manipulations sur les poissons, j'ai marqué les cellules avec l'aide d'anticorps, ou utilisé des lignées de poissons transgéniques exprimant la GFP, sous un promoteur de facteur de transcription spécifique à une sous-classe de cellule (voir matériel et méthode), puis compter les corps cellulaires et examiner leurs projections axonales en imagerie. Selon les données de Reynolds et al publiés auparavant en 2008, l'expression de KCC2 est bel et bien absente durant la première journée, soit une journée avant l'éclosion, puis est progressive durant le développement comme montré à la figure 4.

La première partie de mon projet fut de détailler l'effet de l'expression précoce de KCC2 dès la première journée de développement et son effet sur la population cellulaire de la moelle épinière par une analyse morphologique. La surexpression de KCC2 a produit plusieurs changements majeurs dans le développement de la larve du poisson zébré. Premièrement, la taille de l'embryon était réduite par rapport aux poissons sauvages. La tête et les yeux étaient eux aussi plus petits et la courbe de la queue était un peu plus prononcé que normal. Aussi, la diminution de la pigmentation de la peau était visible. Les poissons affectés avaient de plus, un comportement stéréotypé locomoteur de réponse au toucher déficient, tout comme décrit dans l'article de Reynolds et al 2008. Cet article suggère que ce comportement est dû à la perturbation du développement du cerveau et de la moelle épinière. Ceci en conséquence à une diminution de la population cellulaire du système nerveux. Plus en détail, pour vérifier quelles populations cellulaires étaient affectées, j'ai commencé par utiliser un anticorps primaire détectant le marqueur de différenciation neuronale précoce HuC (Kim et al 1996), marquant les cellules venant tout juste de quitter le cycle cellulaire. J'ai effectivement remarqué qu'il y avait

significativement moins de marquage dans les poissons injectés, comme montré à la figure 7.

Afin de caractériser les populations neuronales affectées, j'ai eu recours à divers marqueurs cellulaires (voir figure 2). J'ai utilisé l'anticorps anti-Pax2 pour marquer un grand nombre de cellules récemment différenciées, en particulier les cellules glycinergiques (Burrill et al 1997). Les motoneurones ont été identifiés avec la lignée transgénique exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le promoteur de *Islet1*, un gène exprimé dans les motoneurones primaires (bande ventrale) en plus de quelques interneurones ectopiques (Uemura et al 2005). Ces données ont aussi été validées avec la lignée transgénique exprimant la GFP sous le promoteur de *HB9* un gène homéoboîte nécessaire à la détermination des motoneurones (Arber et al 1999). Les neurones sensoriels ont été identifiés grâce à la lignée *Ngn* qui expriment la GFP sous le promoteur de la neurogénine 1, exprimé dans ce type de neurone (Blader et al 2003; Cheng et al 2006). Pour raffiner l'investigation, j'ai aussi utilisé des lignées transgéniques récemment créées au laboratoire et par des collaborateurs. La lignée transgénique *Evx1*-GFP a été utilisée pour voir de façon plus spécifique le développement des interneurones V0 (*CoPa*, *CoSa* et *CoB* principalement) (Suster et al 2009). De la même façon, la lignée développée pour regarder le développement des interneurones V2a (*CiD* et *VeLD*) a été utilisée en identifiant la GFP émise par les neurones l'ayant exprimé sous le promoteur *Alx* (Kimura et al 2006). Aussi pour bien visualiser les neurones V1, un anticorps *Eng* a été utilisé (Ekker et al 1992; Fjose et al 1988). Une autre lignée récemment créée a été utilisée pour visualiser les précurseurs d'oligodendrocytes exprimant *Plp* (Yoshida & Macklin 2005). Pour visualiser les cellules exprimant le *gata3* (neurones GABAergique), un anticorps détectant *GAD65/67*, l'enzyme responsable de la conversion du gaba, a été utilisé. Pour terminer, le marqueur de mitose phospho-histone 3 a été aussi détecté par un anticorps spécifique pour déterminer le pourcentage de cellules en mitose dans la moelle épinière. Le marquage de *BrdU* ayant été problématique de par des problèmes de pénétrance, nous nous sommes fiés aux données fournies par Reynolds 2008 concernant le cycle cellulaire des poissons injectés avec l'ARNm de *KCC2*. Les mêmes outils ont été utilisés pour les poissons injectés avec le

morpholino $\alpha 2$ et avec les poissons soumis au traitement de strychnine à 100 μM (10 μM donnant un résultat variable).

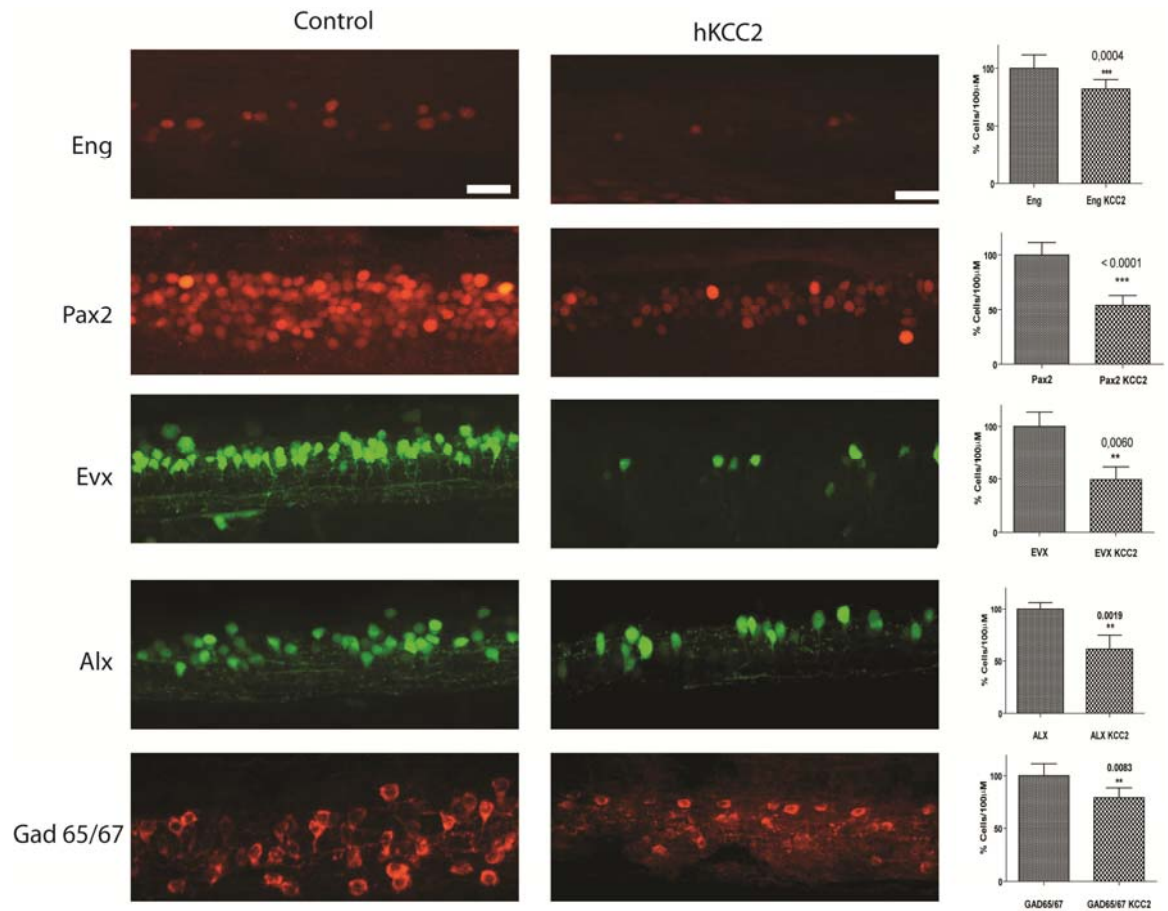


Figure 5. Immunohistochimie des interneurones de poissons sauvages et de poisson injectés avec l'ARNm de KCC2. Immunohistochimie d'une portion d'environ 200 μm ou 4 somites (14-18), de la moelle épinière de poissons zébrés ainsi qu'environ 200 μm de moelle épinière de poissons transgénique exprimant la GFP sous différent promoteur. Diminution du marquage interneuronal de Pax2, Evx1, Alx, Eng, et de GAD65/67 résultant de l'effet de l'injection de l'ARNm humain de KCC2 dans les ovocytes de poissons zébrés. Statistiques voir tableau I.

Ces expériences démontrent clairement que lorsqu'on devance l'apparition du transporteur KCC2 en le surexprimant dans des embryons très jeunes (quelques cellules), octroyant ainsi

la fonction excitatrice au GABA et à la glycine durant tout le développement (Reynolds et al 2008b), il y a perte globale d'interneurones dans la moelle épinière. Ces données sont aussi appuyées par des expériences de Reynolds et de McDearmid démontrant l'absence de nécrose ou d'apoptose dans la moelle épinière dans les mêmes conditions expérimentales, ce qui démontre un défaut de neurogénèse et non pas une dégénérescence des cellules déjà développées. Les populations de neurones sensitifs (Ngn1), de motoneurones (ISL) et de précurseurs d'oligodendrocytes (PLP) ne semblent pas affectées par la délétion du gradient de chlorure, ni les précurseurs d'oligodendrocytes comme démontré à la figure 6. On peut dénoter une incohérence entre ces résultats et ceux obtenus par Reynolds et al au niveau de la population de motoneurone. En effet, dans cette publication, on voit une diminution de cette population alors qu'ici les résultats ne sont pas significativement différents étant donné une barre d'erreur plus grande. Un échantillonnage similaire a pourtant été appliqué pour comparer les résultats (n=7 pour Reynolds et n= 13 ici).

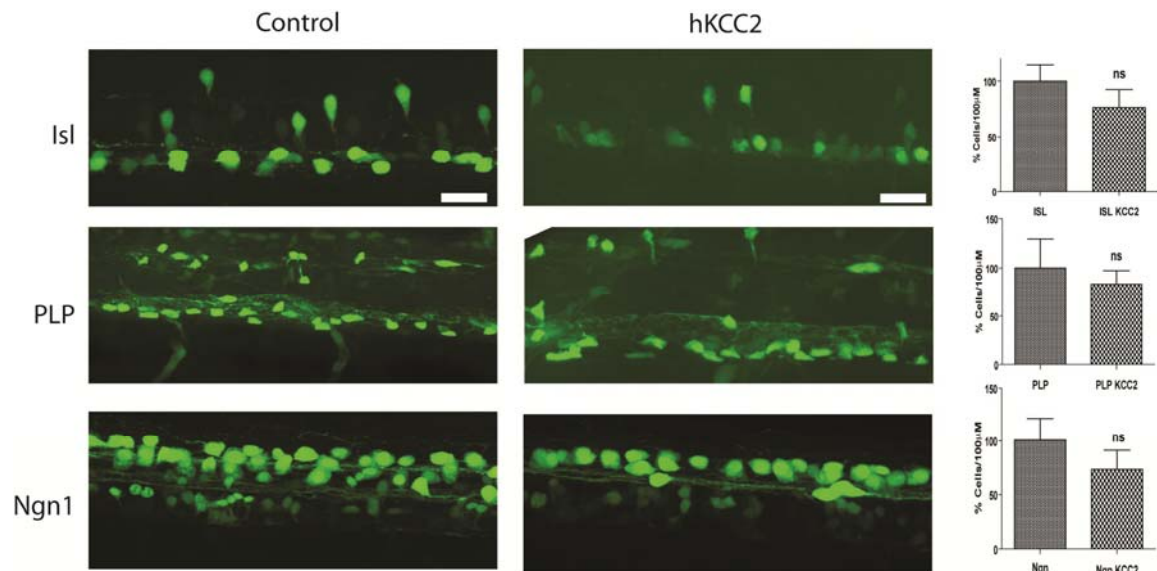


Figure 6. Immunohistochemistry des autres neurones constituant la moelle épinière de poissons sauvages et de poisson injectés avec l'ARNm de KCC2. Aucun effet de la

surexpression de hKCC2 dans la population non interneuronale constituant la moelle épinière. Statistiques voir tableau II.

À l'aide de la figure 5 et de la figure 6, on peut bien voir la spécificité interneuronale de l'effet de la surexpression de l'ARNm de KCC2. Pour vérifier la prolifération cellulaire, j'ai par la suite effectué des marquages en utilisant HU, un marqueur de différenciations neuronal précoce. Comme on peut voir sur la figure 7, ce marquage est diminué significativement dans la moelle épinière des larves injectées avec l'ARNm de KCC2 à deux jours. Pour ce qui est de la mitose, le marqueur mitotique Phospho-histone 3, nous montre qu'il ne semble pas y avoir de différence significative entre la quantité de cellules en mitose dans la moelle épinière, du moins à deux jours de développement.

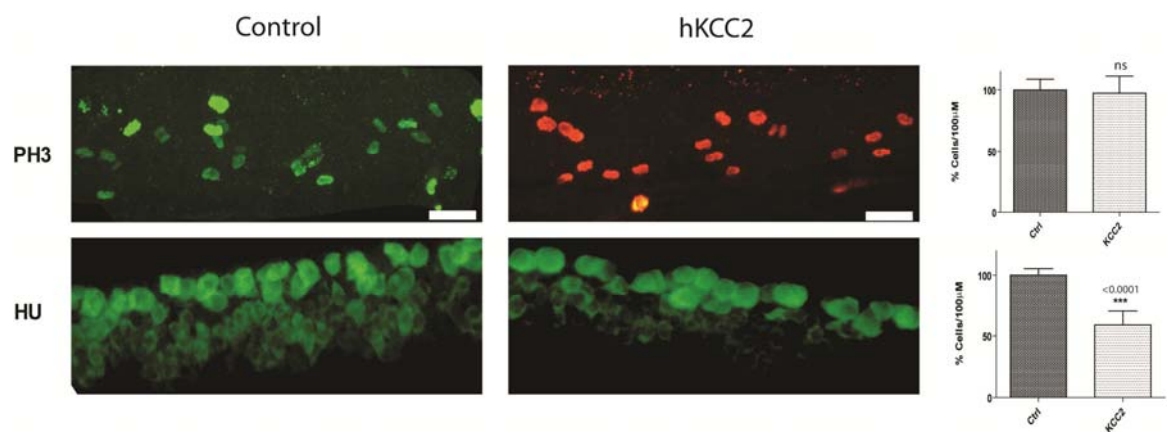


Figure 7. Immunohistochimie de HU et PH3 de la moelle épinière de larves de poissons zébrés sauvages et injectés de l'ARNm de KCC2 à deux jours post-fertilisation. A. Immunohistochimie de HU démontrant une diminution significative du nombre de cellules arborant ce marqueur dans les poissons expérimentaux KCC2. Ces cellules sont quantifiées dans l'histogramme adjacent. B. Immunohistochimie de PH3 démontrant une population inchangée du nombre de cellules arborant ce marqueur dans les poissons expérimentaux KCC2 comparée aux sauvages. Ces cellules sont quantifiées dans l'histogramme adjacent. Statistiques voir tableau III.

La diminution de l'activité glycinergique par blocage pharmaceutique, ou l'atténuation de l'expression de ce récepteur perturbe le développement neuronal.

Pour examiner le rôle précis du récepteur glycinergique dans le développement du système nerveux embryonnaire, j'ai utilisé deux différentes approches. Premièrement, des microinjections de morpholino, molécules d'oligonucléotides antisens, ont été utilisées pour l'inactivation du gène GlyR exprimé au stade embryonnaire (McDearmid et al 2006). Dans cette publication, il est démontré en immunobuvardage de type western que l'expression de la sous-unité alpha (maintenant classifié alpha 4a) (Hirata et al 2009) du récepteur glycinergique a été abolie par l'injection de morpholino. Nous pouvons voir dans la figure suivante que l'injection de morpholino dégrade également l'ARNm qui n'est pas détectable en RT-PCR ce qui confirme les observations de McDearmid et al.

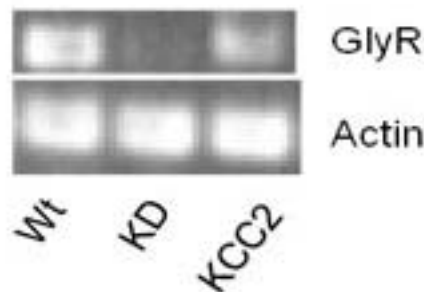


Figure 8. RT-PCR GlyR. RT-PCR de la sous unité alpha du récepteur glycinergique dans la larve du poisson zébré sauvage, injecté avec le morpholino alpha2 et injecté avec l'ARNm de KCC2 humain, à une journée post fertilisation. L'ARNm de la sous-unité alpha est bien dégradé dans les poissons injectés du morpholino (KD).

En second lieu, j'ai aussi utilisé une molécule inhibitrice de récepteurs cellulaires glycinergique, la strychnine (S100), durant les premiers jours de développement du poisson zébré. La réduction de l'expression (knockdown) de la sous-unité alpha du récepteur de la glycine (inhibant sa fonction), ainsi qu'une approche pharmacologique (S100) provoque aussi une diminution de la population d'interneurones dans la moelle épinière comme on peut le voir à la figure 9.

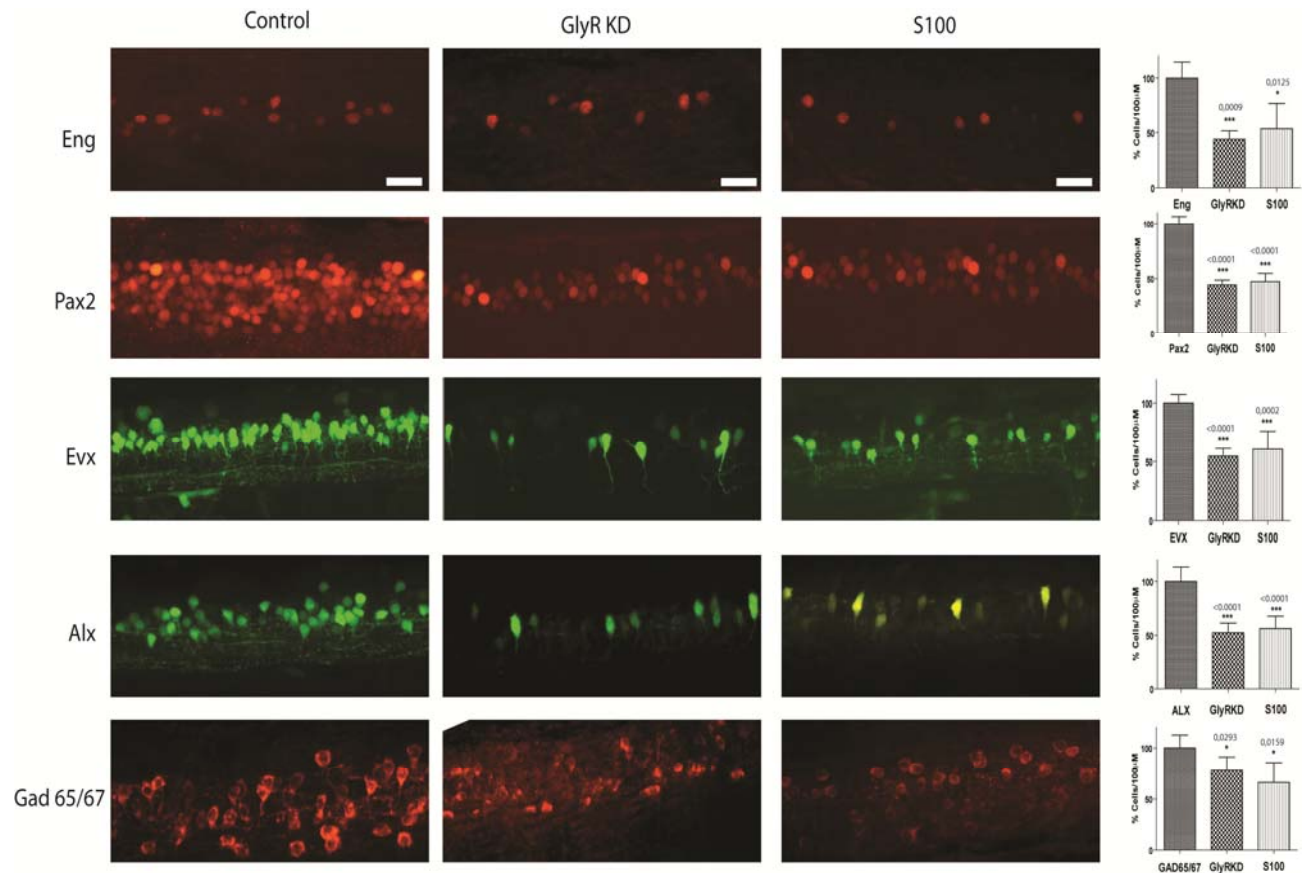


Figure 9. Immunohistochimie des interneurons de poissons sauvages et de poissons injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique. Réduction générale de la population interneuronale dans les conditions expérimentales. Comparaison entre le nombre de cellules marqué dans la moelle épinière de poissons contrôles (injecté avec du tampon Evans) et de poissons injectés avec le morpholino ciblé contre l'ARNm du récepteur glycinergique embryonnaire et des poissons traités chroniquement avec 100uM de Strychnine (S100). Statistiques voir tableau I.

Tout comme les expériences avec le transporteur KCC2 démontré auparavant, les traitements bloquant la transmission glycinergique dans les phases précoces de développement neuronal induisent une perte d'interneurones global dans la moelle épinière du poisson zébré. Il n'y a donc pas de types d'interneurones précis qui ne sont pas affectés par la perte de fonction du récepteur ou par l'inversion du gradient de chlorure. Ce phénomène semble donc impliquer un mécanisme de développement commun à toutes les classes d'interneurones. Aussi, une comparaison avec d'autres types cellulaires a démontré les mêmes résultats que McDearmid et Drapeau c'est-à-dire une légère diminution des motoneurones en condition pharmacologique chronique (Figure 10). On peut voir que la population exprimant PLP n'est pas affectée sous conditions expérimentales et celles exprimant Ngn1 ne sont pas affectées par l'injection de morpholino, mais l'est légèrement en condition pharmacologique. Nous pouvons expliquer ces changements au niveau des poissons S100 de par la présence chronique de la strychnine qui peut avoir des effets secondaires inconnus qui s'addition à l'effet du blocage du récepteur glycinergique pour perturber le développement des neurones exprimant Isl1 (motoneurone à la bande ventrale) et Ngn1.

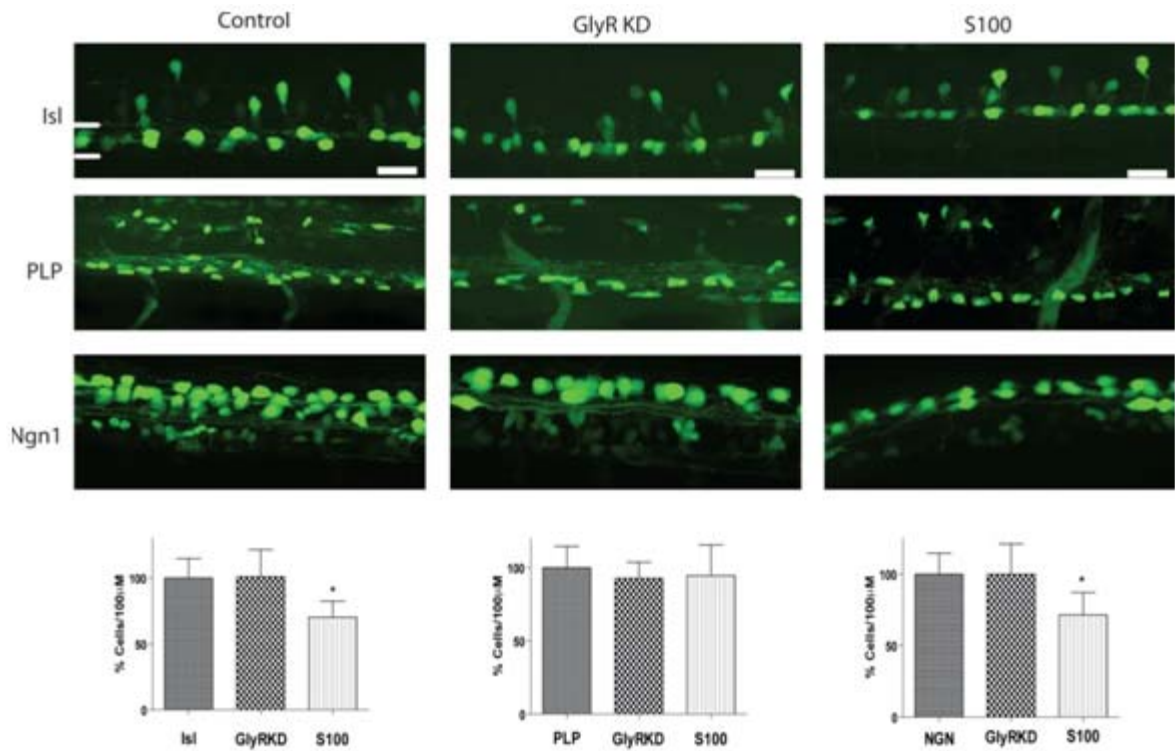


Figure 10. Immunohistochimie des autres neurones constituant la moelle épinière de poissons sauvage et de poisson injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique. En général, aucuns effets n'a été remarqué dans ces population, excepté pour l'application chronique de strychnine (S100) qui à provoquer une légère diminution des neurones moteurs et sensoriels. Seules les cellules ventrales ont été dénombrées chez les poissons de la lignée Isl (entre les bandes blanches). Statistiques voir tableau II.

Tout comme auparavant avec KCC2, je me suis intéressé à la naissance neuronale dans la moelle épinière et j'ai effectué des marquages Hu et PH3 mais cette fois-ci j'ai suivi les populations cellulaires exprimant ces marqueurs dans le temps, c'est-à-dire à 1, 2 et 3 jours post fertilisation. Pour commencer, j'ai fait les marquages Hu. Ainsi, en suivant les neurones nouvellement formés avec ce marqueur il était possible de suivre dans le temps la courbe de sortie du cycle cellulaire et donc la prolifération des progéniteurs neuronaux. Aussi, en ajoutant les données recueillies par le marquage PH3 qui détecte les cellules mitotiques en phase G2/S il était possible de discriminer quelles cellules étaient nouvellement nées et quelles cellules étaient nouvellement sorties de la mitose. En proportion, ces données peuvent nous donner une approximation du taux de cellules en formation et en phase postmitotique (figure 11).

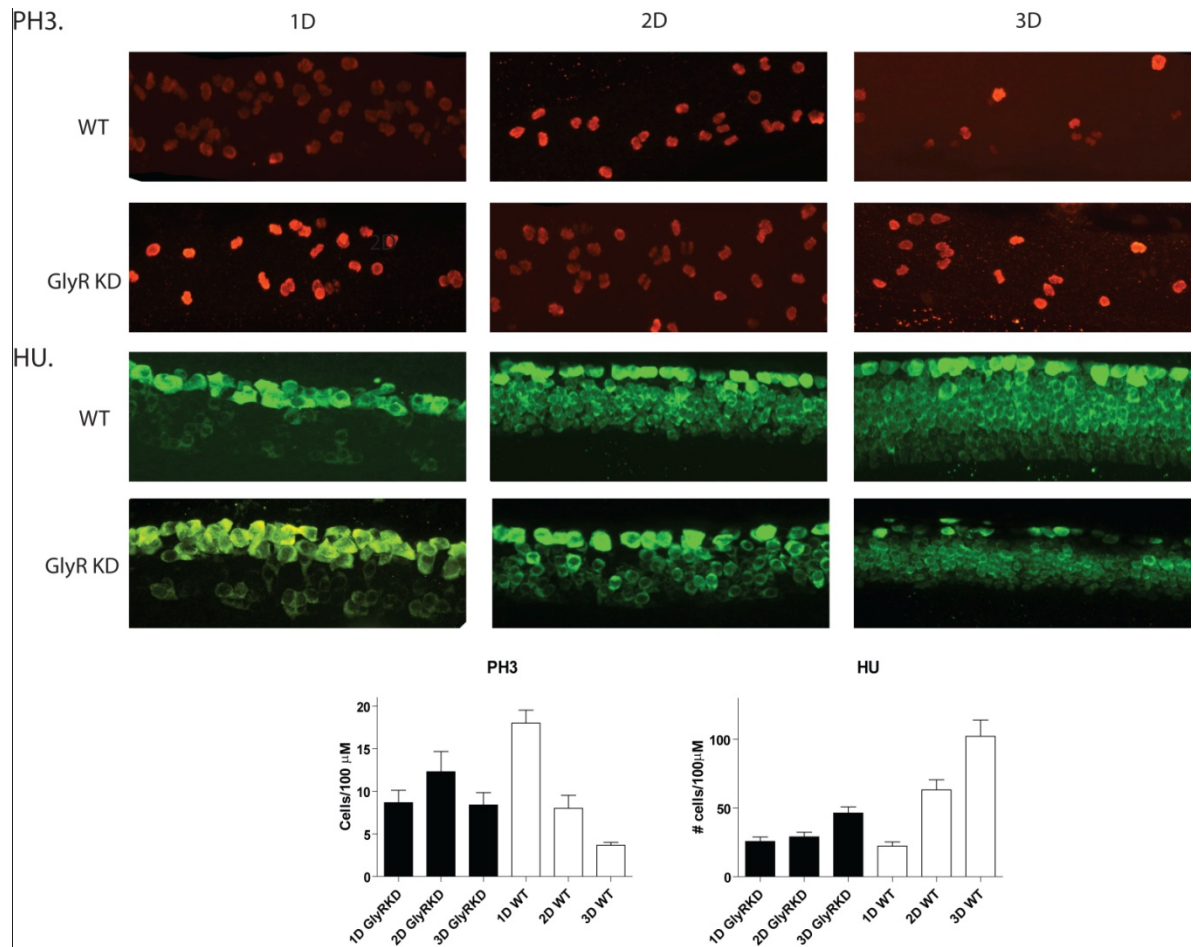


Figure 11. Immunohistochimie de HU et PH3 de la moelle épinière de larves de poissons zébrés sauvages et injectés avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique, dans le temps. A . Immunohistochimie de PH3 dans le temps, sur 3 jours B. Immunohistochimie de HU dans le temps, sur 3 jours. Statistiques voir tableau IV.

Dans la figure 11 nous pouvons clairement voir qu'il y a, premièrement une nette différence entre la proportion de cellules nouvellement formées dans les larves injectées avec le morpholino et les non-injectés. Les cellules nouvellement formées suivent une courbe qui semble décroître de façon linéaire dans le temps chez les poissons sauvages. Cette tendance est plus ou moins respectée chez les poissons affectés, mais ce qu'on peut nettement remarquer est que globalement, à partir du 2^e jour, il y a moins de cellules nouvellement formées dans les poissons affectés. Deuxièmement, avec les données recueillies des marquages PH3, nous pouvons clairement voir que la mitose diminue avec le temps dans la moelle épinière du poisson sauvage. La différence marquante avec les spécimens affectés est que la courbe de mitose semble augmenter au 2^e jour pour rediminuer par la suite au 3^e jour. On peut affirmer que ces données ne sont pas issues d'un retard de développement global puisqu'en double marquage, on peut voir la population de neurones moteurs inchangés (ISL) entre les deux groupes tout comme dans les expériences précédente publiés par Raynolds et Drapeau et McDearmid et Drapeau. Donc en résumé, moins de cellules sont formées et le marquage mitotique montre que les cellules tentent en vain de se diviser. Ces données corroborent celles du McDearmid et Drapeau qui avait de plus, effectué des marquages au BrdU, molécule qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en phase S du cycle cellulaire. Ils ont aussi observé une accumulation des cellules en division dans le temps avec cette technique. Notons aussi qu'il n'y avait aucune apoptose ou nécrose dans les organes ciblés dans ces expériences. Avec les données de Reynolds et al, McDearmid et al, ainsi que celles présentées précédemment, nous pouvons donc affirmer que les changements observés dans la population cellulaire de la moelle épinière sont dus aux conditions expérimentales.

Pour investiguer l'effet du GABA sur le développement, j'ai effectué des expériences pharmacologiques en suivant le même protocole qu'avec la strychnine. J'ai donc soumis les embryons à un traitement chronique à diverses concentrations de picrotoxine et de bicuculine, deux antagonistes des récepteurs GABAergiques. Dans les deux cas, à des doses modérées, les embryons traités ne différaient pas au niveau cellulaire des embryons sauvages. À fortes doses, ces drogues interféraient toutes deux avec le développement normal et étaient dans la majorité des cas létales, ou produisaient du moins, des malformations extrêmes. J'ai de plus, examiné une lignée de poissons zébrés portant une mutation dans le gène codant pour la sous-unité beta du récepteur glycinergique nommé *bandoneon (beo)* (Haffter & Nusslein-Volhard 1996; Hirata et al 2005) Cette sous-unité est essentielle à la localisation synaptique du récepteur de par son interaction avec la géphyrin (Laube et al 1995; Meyer et al 1995). Ce mutant a une perte de transmission glycinergique, mais répond à l'apport exogène de neurotransmetteurs, indiquant qu'il possède bien des récepteurs activables à la surface cellulaire de ses neurones. En observant la composition cellulaire de la moelle épinière de cette lignée, j'ai pu conclure que le système nerveux de ces larves se développait normalement et que les populations cellulaires constituant la moelle épinière de ces poissons étaient en quantité normale comme montrée à la Figure 12.

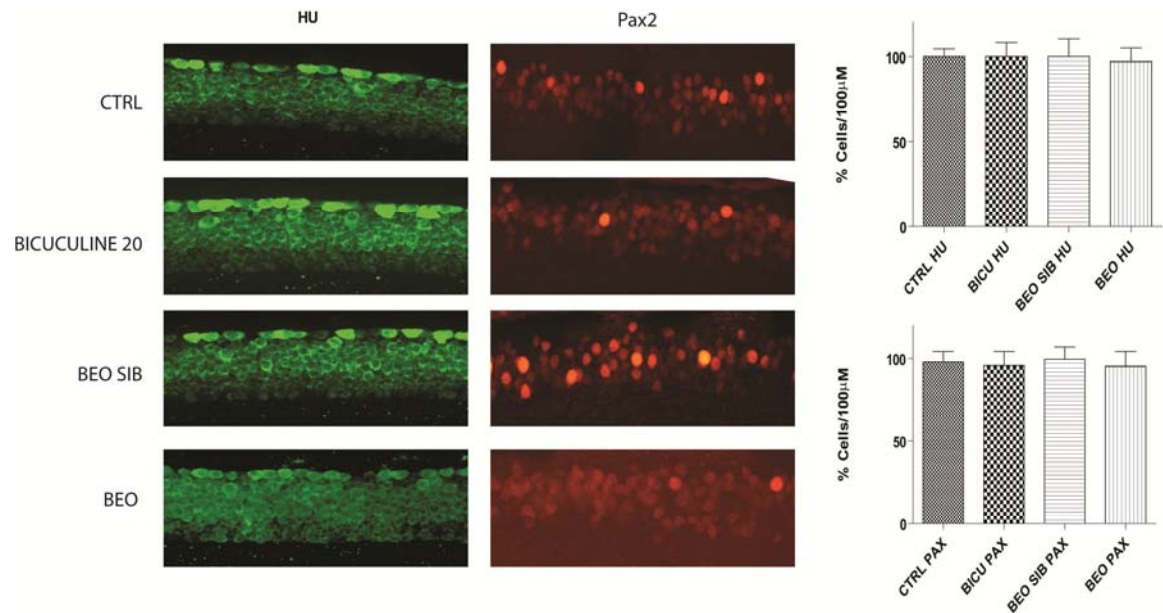


Figure 12. Immunohistochimie des poisson *bandoneon* et de poissons sauvage traité avec la bicuculine. Comparaison des populations cellulaires exprimant Hu ou Pax2 chez les poissons zébrés de la lignée *bandoneon* (*beo* $-/-$), chez les poissons non-mutants porteurs (+/-) de la mutation *bandoneon* et chez les poissons sauvages traités chroniquement avec 20 μ M de bicuculine. Statistiques voir tableau V.

Pour terminer et en résultats préliminaire à de futures expériences, j'ai décidé de tester de façon pharmacologique l'hypothèse selon laquelle la dépolarisation médiée par la liaison de la glycine à son récepteur provoquerait l'entrée d'ions calciques. Ces ions seraient alors responsables du bon développement des neurones par des mécanismes cellulaires. Cette hypothèse est logique puisque le calcium est déjà impliqué dans plusieurs processus de développement neuronaux par exemple la maturation des neurones. Donc pour tester cette hypothèse, j'ai décidé de laisser la signalisation glycinergique intacte, mais de perturber la signalisation calcique en bloquant les canaux calciques de type L à bas voltage avec une drogue nommée nifédipine (voir matériel et méthode). Ces canaux sont susceptibles d'être responsables de l'entrée des ions calciques dans les neurones immatures puisqu'ils sont activés à bas voltage et qu'ils sont présumés présents dans la moelle épinière de façon très précoce. (Huang & Li 2006; Sanhueza et al 2009; Zhou et al 2008). Comme on peut le voir dans la figure 13, la drogue a eu un effet similaire au KD du récepteur glycinergique, à l'application de la strychnine, ainsi qu'à l'inversion du potentiel d'ions chlorure (KCC2). Ces résultats sont très prometteurs et nécessitent une investigation future.

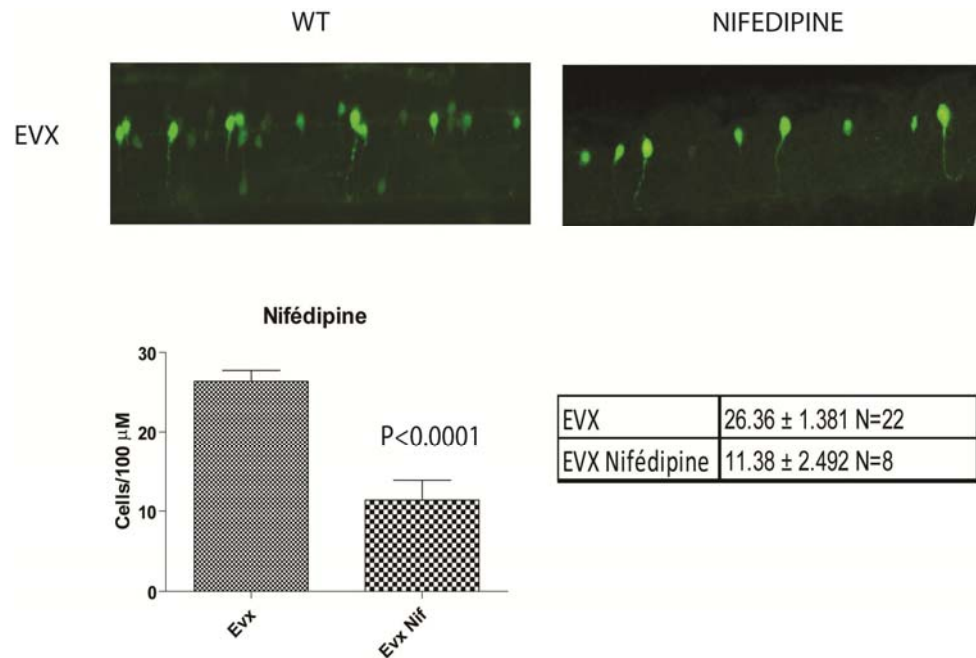


Figure 13 : Décompte cellulaire des poissons de la lignée [evx:GFP] sous conditions expérimentales impliquant la Nifédipine, un bloqueur des canaux calciques de type L. Une diminution de la population des neurones exprimant la GFP peut être observée dans les conditions expérimentales.

Discussion

Dans cette section, je résumerai et discuterai des effets de mes expériences sur les embryons de poisson zébré. J'élaborerai sur le modèle proposé par Reynolds et McDearmid et je discuterai aussi de nouveaux questionnements et directions futurs, engendrés par les résultats de mes manipulations. L'article de Reynolds et al était la première étude portant sur l'effet du KCC2 dès les premiers jours de développement du système nerveux *in vivo* et aussi la première étude utilisant le modèle poisson zébré pour étudier son rôle durant la neurogénèse. À une journée post fertilisation, les embryons ne possèdent pas d'ARNm endogène de KCC2. En complémentarité au travail de Reynolds et al, j'ai réussi à démontrer que la surexpression de ce gène provoque donc des changements morphologiques, des changements au niveau comportemental et au niveau de la neurogénèse. Mes résultats décrivent avec plus de précision les changements morphologiques et cellulaires provoqués par cette surexpression, durant la neurogénèse du poisson zébré. Plus exactement, j'ai bien démontré que la différenciation des interneurones en général, incluant ceux exprimant Eng, Pax2, Evx, Alx et Gad65/67, est non seulement altéré, mais que ces populations sont dans tous les cas diminuées environ de moitié. En accord avec ces résultats nous pouvons aussi voir que la moelle épinière des poissons affectés contient moins de neurones totaux (HU) et est moins développée que celle des poissons sauvages. L'effet observé semble être plus spécifique aux interneurones, car nous ne voyons pas de changement significatif au niveau des autres populations constituant la moelle épinière à cette étape du développement, soit les motoneurones (Isl), les précurseurs d'oligodendrocytes (PLP) et les neurones sensoriels (Ngn). Dans les résultats précédents de Reynolds contrairement à ceux de McDearmid, les motoneurones semblaient être altérés par les expérimentations, mais le nombre d'échantillons était seulement de 7 comparativement à 13 pour mes données. En ajoutant des données, je n'ai pas trouvé de différences significatives au niveau de ce type cellulaire particulier.

La mitose des cellules composant la moelle épinière ne semble pas être affectée dans ces conditions, ce qui est en accord avec les précédents résultats de prolifération obtenus par marquage BrdU par Reynolds et al. Un autre résultat intéressant et aussi démontré par Reynolds et al, consiste au maintien de la population des progéniteurs, sans morts cellulaires. Il n'y a effectivement pas d'augmentation de cellules marquées avec acridine orange dans les poissons injectés comparativement aux contrôles. Le mécanisme en jeu diminuant la population neuronale de ces poissons dans ces conditions semble donc être indépendant de la mort cellulaire. J'ai démontré qu'effectivement les cellules non différenciées des poissons injectés avaient un taux de mitose semblable au contrôle par immunohistochimie en utilisant un anticorps ciblant Phospho-Histone 3. Après cette mitose, environ la moitié de ces cellules ne se différencie pas, ou du moins elles ne produisent pas de marqueur de différenciation précoce comme HU. Il semble donc qu'il y ait un manque de signal de différenciation. Ces cellules semblent donc former un groupe de progéniteurs non-différenciés qui ne se divisent plus, mais qui semble attendre un signal de différenciation, et ce, sans entrer en apoptose. En effet, on aurait pu croire que ces cellules indifférenciées adopteraient un autre destin cellulaire tel que la maturation en cellule gliale, mais ça ne semble pas être le cas ici parce que mes expériences complémentaires avec la lignée PLP démontrent qu'il n'y pas augmentation de précurseur d'oligodendrocytes présent dans la moelle dans ces conditions.

Pour continuer d'étudier l'effet de la dépolarisation médié par la glycine et le gradient de chlorure, j'ai fait des manipulations ciblant directement le récepteur glycinergique lui-même. Premièrement avec une approche pharmacologique, en utilisant 100 μ M de strychnine dans un bain et en appliquant chroniquement cette dose durant le développement de l'embryon, j'ai pu bloquer la dépolarisation médiée par la glycine (McDermid et al 2006). Les résultats obtenus sont en accord avec les précédents c'est-à-dire que les interneurones semblaient être en totalité affectés par l'application de la drogue. Comme avec l'injection de l'ARNm de KCC2, les interneurones exprimant Eng, Pax2, Evx, Alx et GAD65/67 étaient tous diminué environ de moitié dans la moelle épinière des poissons traités. Encore concordant avec les résultats antérieurs, la population de précurseur

d'oligodendrocytes exprimant PLP n'est pas changé, ne dénotant pas un changement de destin cellulaire de ces neurones manquants vers la gliogénèse. Cependant, la population de motoneurones (ISL) ainsi que la population de cellules sensorielles (NGN) semblent être très légèrement affectées par l'apposition de la drogue de façons chronique. J'attribue ce résultat à un effet secondaire de la strychnine qui, à forte concentration comme celle utilisée dans mes expériences (100 μ M), peut agir sur d'autres récepteurs par exemple le récepteur nicotinique à acétylcholine (Yadid 1994) ce qui peut engendrer un effet pharmacologique indépendant, mais s'ajoutant aux effets encourus par le blocage du récepteur glycinergique.

Pour ajouter à ces données, j'ai aussi utilisé une approche moléculaire en supprimant la traduction de l'ARNm du récepteur glycinergique embryonnaire. McDearmid avait déjà effectué des expériences en utilisant un morpholino ciblant à l'époque ce qu'on croyait être la sous-unité $\alpha 2$ du récepteur glycinergique embryonnaire. La séquence utilisée pour produire le morpholino est la séquence codante $\alpha Z2$, associé à la sous unité GlyR $\alpha 2$ (Imboden et al 2001). Cette protéine a par la suite été reclassifiée en se basant sur des études phylogéniques plus poussées et est maintenant associée à une seconde sous-unité de $\alpha 4$ (Imboden et al 2001). Donc, basé sur cette étude et celle de Kuwada en 2010, $\alpha Z2$ a été renommé $\alpha 4a$ et $\alpha Z4$ a été renommé $\alpha 4b$ et les gènes ont respectivement été renommés *glra4a* et *glra4b*. En utilisant la nouvelle annotation du génome ZV8, l'équipe de Kuwada (Hirata et al 2009) a identifié un nouveau gène sur le chromosome 9 qui semble encoder $\alpha 2$ (GenBank [GQ406228](#)). Cette équipe a aussi amplifié l'ADNc codant pour le N-terminal de $\alpha 4a$ qui contient un signal de clivage peptidique (GenBank [GQ406229](#)). L'existence de deux orthologues d'un même gène de mammifère est commun dans le génome du poisson zébré dû à la duplication suspectée du génome en entier durant l'évolution du poisson (Amores et al 1998). À cause de cette découverte et aussi basé sur la séquence en acides aminée (Bormann et al 1993) (Wang et al 2007) et aux patrons d'expression génique (Hirata et al 2005), il est donc maintenant accepté que le poisson zébré possède cinq gènes codant pour la sous-unité alpha (*glra1*, *glra2*, *glra3*, *glra4a* et *glra4b*) et deux pour la sous-unité beta (*glrba* et *glrbb*) du récepteur glycinergique. Si

McDearmid avait bien prouvé que le morpholino utilisé abolissait la traduction de $\alpha 2$, maintenant renommé $\alpha 4a$, mes résultats ont démontré que le morpholino était aussi efficace pour dégrader l'ARNm de $\alpha 4a$ qui est basé sur la nouvelle séquence décrite par Kuwada (figure 8). Ayant ce fait en tête, j'ai pu procéder au décompte cellulaire sur les poissons ayant été injectés avec ce morpholino. La perturbation de la transmission glycinergique (McDearmid) dès le début du développement embryonnaire avec une approche de KD a produit les mêmes effets prédominants que les expériences précédentes. J'ai ainsi observé une diminution drastique de la population d'interneurones exprimant les mêmes marqueurs mentionnés précédemment soit Eng, Pax2, Evx, Alx et GAD56/67, tout en n'observant aucun changement des niveaux de cellules exprimant Isl, PLP et Ngn. Cet effet a de plus été accompagné d'une population de cellules mitotiques demeurant anormalement élevées dans le temps, comparativement aux contrôles. Cet effet a aussi été observé par des marquages au BrdU par McDearmid. Combinés, ces résultats suggèrent que la transmission glycinergique agirait de façon précoce pour réguler la différenciation neuronale.

Le fait que la proportion de cellules mitotiques reste élevée avec le temps pourrait mener à un plus grand nombre de neurones différenciés. Les résultats observés démontrent que l'effet est contraire, soit qu'il y a moins de cellules marquées avec Hu. Il semblerait donc que les cellules soient "bloquées" en phase mitotique et ne réussissent pas à sortir du cycle cellulaire. Cet effet ne semble pas être présent dans les expériences sur le gradient chlorure avec la surexpression de KCC2 puisque les niveaux de prolifération sont normaux dans les poissons injectés de l'ARNm de KCC2. Une hypothèse mentionnée par Reynolds et al est que le signal dépolarisant, médié par la glycine et régulé par le gradient chlorure, soit uniquement nécessaire aux phases terminales de différenciation contrairement au signal induit par la glycine, qui semblerait être nécessaire aux phases plus précoces de développement. Une donnée supplémentaire confirmant en partie cette hypothèse est la présence d'une moelle épinière constituée d'un nombre de neurones normal chez le mutant *Bandoneon* (*Beo*). Ce mutant possède une mutation dans la sous-unité beta du récepteur glycinergique (Hirata et al 2005). Comme mentionnée dans les résultats, cette sous-unité est essentielle à la localisation synaptique du récepteur de par son interaction avec la géphyrin

(Meyer et al 1995). Ce mutant a lui aussi une transmission glycinergique altérée, mais répond à l'apport exogène de la glycine, indiquant qu'il possède bien des récepteurs activables à la surface cellulaire des neurones. En observant la composition cellulaire de la moelle épinière de cette lignée, j'ai pu conclure que le système nerveux de ces larves se développait normalement et que les populations cellulaires constituant la moelle épinière de ces poissons étaient en quantité normale comme montrée à la Figure 12. Ceci soutient l'hypothèse de l'importance de la glycine de façon non-synaptique ou paracrine, dans le développement.

Un aspect important à ne pas sous-estimer dans l'hypothèse engendrée ici est d'élucider la provenance de ce neurotransmetteur. La glycine présente de façon précoce pourrait être originaire de mécanisme de transport inverse, d'hémicanal jonction-gap ou encore d'échangeur d'ions (Benardete & Kriegstein 2002; Owens & Kriegstein 2002). Les cellules en prolifération, en migration ou des cellules déjà différenciées pourraient être la source paracrine ou autocrine de cet apport en neurotransmetteur. Il est raisonnable de penser que le transport vésiculaire synaptique n'est pas en jeu ici puisque les changements morphologiques se produisent de façon plausible, avant la synaptogénèse. Il est alors probable que des relâchements vésiculaires spontanés de glycine soit à l'origine de la présence du neurotransmetteur dans la moelle épinière en développement (Saint-Amant & Drapeau 2000a). L'analyse morphologique grossière du mutant *bandoneon* penche aussi en faveur de cette hypothèse. La figure 14 résume bien les possibles mécanismes qui pourraient être en jeu ici.

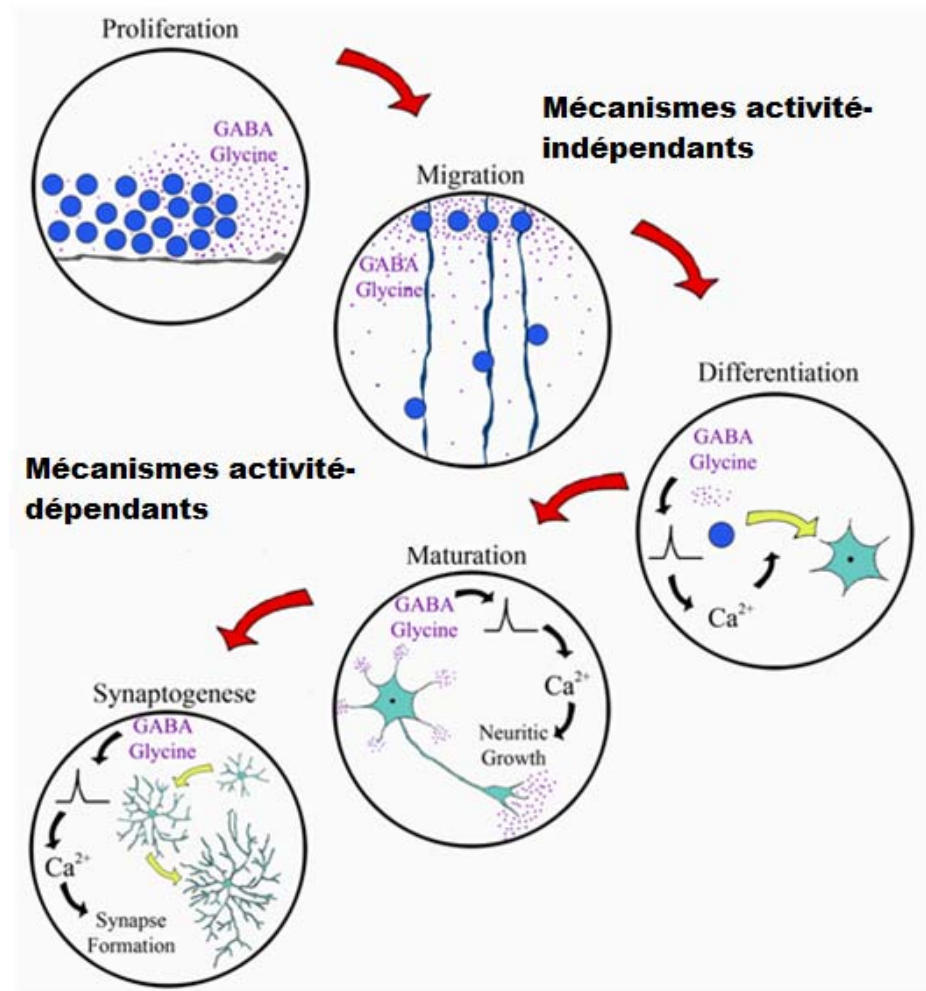


Figure 14 : Modèle impliquant différents rôles de la Glycine pendant la neurogénèse.

Dans cette figure est résumée les principales étapes et rôles hypothétiques de la glycine dans le développement du système nerveux selon les résultats compilés de Reynolds, McDearmid et ceux de mes expériences. Au niveau de la prolifération, les progéniteurs restent en cycle cellulaire et en sortent dépendamment des signaux chimiques qu'ils reçoivent. La glycine enverrait un signal permissif non-médié par l'activité électrique à cette étape développementale. Dans mes expériences utilisant le morpholino, il y a moins d'interneurones de formés et plus de cellules restent en prolifération dans la moelle épinière. La signalisation médiée par l'interaction de la glycine à son récepteur

embryonnaire semble donc être importante pour la sortie du cycle cellulaire des cellules progénitrices. De façon plutôt grossière et en me basant sur une étude de Huttner (Calegari & Huttner 2003), j'ai tenté de tester l'effet d'une modification de la durée du cycle cellulaire sur la différenciation neuronale. L'étude de Huttner démontrait qu'en utilisant un inhibiteur de kinase cycline-dépendante et de phase G1 du cycle cellulaire, l'olomoucine II, sur des embryons de souris, le cycle de cellules progénitrices était allongé, car la phase G1 du cycle cellulaire était ralentie. Ceci avait pour effet de changer le mode prolifératif des cellules neuroépithéliales en une division cellulaire créant ainsi une neurogénèse précoce et prématurée. En effet, la phase G1 du cycle cellulaire des cellules neuroépithéliales (les progéniteurs de tous les neurones du système nerveux central mammalien), est connue pour être plus longue avec la progression de la neurogénèse. Cette étude a prouvé que cette élongation du cycle cellulaire était une cause et non pas une conséquence de la neurogénèse. J'ai donc décidé d'injecter cette drogue, l'olomoucine II, aux mêmes concentrations utilisées dans l'article de Huttner dans des embryons de 20-24 hrs pour analyser ensuite l'effet sur le développement de la moelle épinière 24 hrs plus tard. Surprenamment, aucun effet de l'application de cette drogue sur le système nerveux du poisson zébré n'a pu être détecté en vérifiant la population globale cellulaire dans mes expériences. Deux explications peuvent être possibles ici : soit la drogue n'a aucun effet sur les cyclines ciblées des cellules de la moelle épinière du poisson zébré, soit le fait de retarder le cycle cellulaire des progéniteurs n'induit pas une différenciation précoce des neurones chez le poisson zébré. Selon mes données préliminaires et mes expériences avec le marquage BrdU, la deuxième hypothèse semble plus probable.

Au cours de la migration, la glycine jouerait un rôle dépendamment de sa concentration locale sur les cellules migrantes le long de l'axe radial. Cet effet a récemment été démontré (Polleux 2009). En effet, il semble que les dernières étapes de migration soient sensibles au voltage en plus d'être associé et dépendant du calcium. Il est logique de penser que puisque les dernières étapes de la migration soient sensibles au voltage et aux effluves de calcium intracellulaire, l'étape subséquente, soit la différenciation soit elle aussi influencée par ces facteurs. La liaison de la glycine à son récepteur médiant une

dépolarisation et provoquant l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule serait donc hypothétiquement responsable de promouvoir la différenciation des interneurons (Ashworth & Bolsover 2002a). Il est aussi connu que ces effluves de calcium agissent sur la maturation des axones et la croissance des dendrites (Tozuka et al 2005) aidant à établir des connexions et un réseau primitif neuronal. À cette étape, la transmission glutamatergique est davantage reconnue comme étant le modulateur de la synaptogénèse (Albrieux et al 2006; Deng et al 2007; Kayser et al 2006). Dans les vertébrés, les canaux calciques sont aussi connus pour jouer un rôle dans la détermination de la plaque dorsale (Palma et al 2001) et dans l'induction neurale chez les amphibiens (Leclerc et al 2006; Webb et al 2005). L'entrée en calcium par les canaux non sensibles au voltage et la libération intracellulaire de réserve de calcium sont connus pour contrôler l'homéostasie calcique dans les cellules non excitables, mais dans les cellules excitables, les canaux voltage dépendant sont nécessaires à l'entrée de calcium.

Pour investiguer le rôle possible du calcium dans le phénomène observé dans mes conditions expérimentales, j'ai utilisé une drogue, cette fois-ci bloquant spécifiquement les canaux calciques de type L, la nifedipine. Ces canaux sont voltage dépendant, activés par une faible dépolarisation et leur activation est lente. (Costa et al 1996; Leclerc et al 1997). Ils semblent être présents chez l'embryon du poisson zébré avant même l'apparition et la différenciation de cellules excitables (Sanhueza et al 2009). L'ARNm et les protéines formant ces canaux ont même été détectés aussi rapidement qu'au stage de 2 cellules post fertilisation, ce qui indique que l'ARNm de ces canaux provient de la transcription maternelle et zygotique. Dans cette étude, les embryons ont été soumis à plusieurs traitements de drogue de façon chronique. De façon surprenante l'examen des embryons traité avec des antagonistes de canaux calciques comme la nifedipine n'a révélé aucune erreur de développement. Ceci contraste avec les résultats de Ashworth 2007 qui avait pourtant démontré l'utilité du calcium dans le développement. Pour ma part, mes expériences ainsi que celles de McDermid, démontrent que, bien que les poissons ne possédant pas le récepteur glycinergique embryonnaire aient une apparence plutôt normale, la population d'interneurones est diminuée significativement et la proportion de cellules en

prolifération est supérieure au contrôle. Les expériences préliminaires effectuées avec la nifédipine appliquée chroniquement dès 6 heures post-fertilisation, ont donnés des résultats similaires au phénotype obtenu avec le morpholino ciblant le récepteur glycinergique c'est-à-dire une diminution de la population de neurone de la moelle épinière. Je n'ai malheureusement pas eu le temps de faire une analyse morphologique complète du phénotype comme on peut le voir à la figure 13.

J'ai aussi déterminé que le GABA n'avait aucun rôle à jouer dans la neurogénèse contrairement à la glycine, en utilisant un antagoniste nommé Bicuculine de façon chronique sous le même protocole expérimental que la strychnine. Je n'ai observé aucun changement morphologique encouru par le traitement à cette drogue ce qui est consistant avec les résultats précédents démontrant que le GABA ne semble pas être sécrété dans la moelle épinière embryonnaire du poisson zébré (Buss & Drapeau 2001). Plusieurs mécanismes sont susceptibles d'être responsable des effets sur le développement neuronal engendré par le blocage de l'activité glycinergique ainsi que de l'entrée de calcium en résultant.

Tout d'abord, une étude antérieure a démontré que l'activation des récepteurs GABAergiques dans les progéniteurs neuronaux de l'hippocampe adulte induit l'entrée d'ions calciques qui active l'expression de gènes proneuronaux (Tozuka et al 2005). Cette entrée de calcium est médiée par la glycine chez le poisson zébré (Ashworth & Bolsover 2002b; Brustein et al 2003). Il est donc logique de penser que ces entrées de calcium médiées par la glycine peuvent jouer un rôle sur le cycle cellulaire des progéniteurs durant le développement. Aussi, plusieurs études ont établi dans le passé un rôle neurogénique à certains neurotransmetteurs comme le GABA et le glutamate (Haydar et al 2000; Liu et al 2005; LoTurco et al 1995; Tozuka et al 2005) en plus de la glycine dans les cellules de la rétine (Young & Cepko 2004). Mes résultats démontrent qu'un mécanisme similaire pourrait être en jeu dans le développement de la moelle épinière du poisson zébré. Mes résultats, en addition à ceux de McDermid, suggèrent que l'activité glycinergique peut réguler la sortie du cycle cellulaire des précurseurs d'interneurones de façon spécifique. J'ai aussi démontré que le calcium pourrait être un acteur important dans ce processus. Il reste

cependant à déterminer le mécanisme précis expliquant comment la transmission glycinergique peut activer la sortie du cycle cellulaire ou encore un programme neurogénique pour permettre le bon développement des interneurons.

Le cycle cellulaire des progéniteurs est considéré comme une bonne cible pour établir un lien, entre les signaux extracellulaires, l'activité neuronale et le développement. Comme on le sait présentement, durant le développement du système nerveux, les progéniteurs neuronaux peuvent soit rester dans le bassin de cellules indifférenciées en prolifération ou encore sortir du cycle cellulaire pour ainsi débiter leur différenciation. Deux principaux facteurs peuvent déterminer le destin du progéniteur ; sa position dans le neuroépithélium et le temps d'initiation de la différenciation. Or, l'origine du déclenchement et l'importance de l'un ou l'autre de ces facteurs par rapport à l'autre sont encore peu détaillées dans la littérature. Une équipe a récemment forcé les progéniteurs à faire le cycle cellulaire et à étudier les conséquences sur la spécification neuronale et sur les programmes de différenciations. Leurs recherches semblent indiquer que le fait de maintenir les progéniteurs en cycle cellulaire est insuffisant pour prévenir la différenciation ou altérer leurs destins cellulaires, ce qui nous laisse présager une spécification indépendante de la sortie du cycle cellulaire, des progéniteurs (Lobjois et al 2008). Cette situation est très différente dans les neurones plus matures ne peut entrer de nouveau le cycle cellulaire et en conséquence subissent une mort cellulaire. Cette voie, lorsque mal régulé peut engendrer des cancers (Liu et al 2010).

D'un autre côté, certaines études démontrent quand arrêtant le cycle cellulaire des progéniteurs en phase G1/S (à l'aide de deferroxamine), cela est suffisant pour augmenter le nombre total de nouveaux neurones formé à partir de culture de neurosphères. Le mécanisme sous-entendant cet arrêt du cycle cellulaire impliquerait une expression prolongée de l'inhibiteur cyclin-dépendent kinase (cdk) p27^{kip} (Mantel et al 1996). Ce mécanisme impliquerait aussi une induction de TGF- β 1, ce qui augmenterait la translocation de smad3 au noyau et activerait p27^{kip}. On sait qu'il existe plusieurs liens entre inhibiteurs de kinases et le calcium. Par exemple p27^{kip} qui est dépendant de la voie

jnk qui elle-même semble être régulée par le calcium (Arthur et al 2000; Brnjic et al 2010; Inanami et al 1999; Mielke 2008; Takahashi et al 1999; Tfelt-Hansen et al 2003). Donc une entrée d'ions calcium (pouvant être glycine dépendante) serait nécessaire pour activer et contrôler certaines voies moléculaires déterminant le destin de ces progéniteurs via le cycle cellulaire. Il s'agit ici d'une voie très intéressante à investiguer dans le futur.

Une autre caractéristique critique et intéressante des précurseurs neuronaux des vertébrés est le déplacement du noyau durant le cycle cellulaire, donnant naissance à un épithélium pseudostratifié (Lees 1995). Ce comportement du noyau appelé " interkinetic nuclear migration" ou INM, semble aussi être contrôlé par des régulateurs de la neurogénèse comme des gènes proneuronaux ou neurogénique (Latasa et al 2009). Ces changements cycliques dans l'expression de ces facteurs fonctionnant en coordination avec le cycle cellulaire et l'INM en plus de la corrélation entre les processus neurogéniques et le cycle cellulaire, en coïncidence avec la localisation apicale des précurseurs dans le neuroépithélium, est un concept nouveau qui risque de bouleverser le domaine dans les prochaines années. Un programme neurogénique pouvant potentiellement être impliqué dans ce cas est la voie de Notch (Latasa et al 2009). En effet, le fait que toutes les interneurones soient affectées par mes traitements démontre que le processus affecté par ceux-ci est très précoce. La voie neurogénique Notch est une voie de différenciation des progéniteurs en neurones qui s'active de façon très précoce. Plusieurs études ont démontré que la signalisation de Notch avait un rôle critique à jouer dans la régulation des progéniteurs dans le développement du neocortex. (Hitoshi et al. 2002; Yoon et al. 2004; Yoon and Gaiano 2005). La voie moléculaire Notch a été grandement étudiée chez le poisson zébré (Hans et al 2004; Ninkovic et al 2005; Pasini et al 2004) et est nécessaire au développement des interneurones (Batista et al 2008; Kim et al 2008; Shin et al 2007). Cette voie régule le nombre de cellules qui, à partir des précurseurs neuronaux en prolifération, adopte un destin neuronal via l'inhibition latérale et via la spécification binaire (binary fate specification), c'est-à-dire l'adoption des cellules avoisinantes d'un autre destin cellulaire. Une autre équipe a démontré que la signalisation de Notch inhibait la formation de motoneurones primaire et avait l'effet contraire sur certains interneurones

(Shin et al 2007). Des études de gains de fonctions ont aussi démontré qu'en activant cette voie moléculaire, il y avait une inhibition de la différenciation neuronale et que les progéniteurs étaient maintenus en prolifération (Gaiano et al 2000; Hitoshi et al 2002; Mizutani & Saito 2005; Rusconi & Corbin 1999). Des études de pertes de fonctions, souvent létales ont supportés cette affirmation (Yoon & Gaiano 2005). Il est aussi discuté dans la littérature que certains types de progéniteurs pourraient utiliser la voie de Notch de façons différentes par exemple en exprimant ou réprimant l'expression de certains facteurs de transcription (Basak & Taylor 2007; Mason et al 2005; Spana & Doe 1996). De plus, certaines expériences démontrent que des kinases (qui sont souvent régulées par une activité calcique) peuvent supprimer l'activité de Notch (Ishitani et al 2010). Bref, tous ces facteurs font de cette voie très étudiée, mais encore trop peu connue, une cible potentielle pour lier l'effet de l'activité glycinergique au destin neuronal.

En addition aux signaux temporels comme le cycle cellulaire et aux signaux spatiaux comme l'inhibition latérale par Notch, certains signaux agissent asymétriquement dans les cellules nouvellement divisées. Ces signaux apportés par la division asymétrique provoquent la formation d'une cellule postmitotique et d'une autre qui demeure une cellule précurseur en prolifération (Gotz & Huttner 2005). Cette division asymétrique est essentielle au maintien de cette balance entre la production de cellules en différenciation et la maintenance des progéniteurs. Dans le poisson zébré, une équipe a récemment publié qu'un compartiment subcellulaire, lorsqu'hérité par une cellule, était destiné à devenir neurone. Cette cellule s'est avéré la plus apicale des deux tandis que la basale repeuplait le bassin de cellule progéniteur (Alexandre et al 2010). Une autre hypothèse pour l'avancement de mon projet est que cet héritage nécessaire à la destinée neuronale pourrait aussi être affecté par l'environnement, dans mon cas par l'activité glycinergique ou l'entrée de calcium provoqué par celle-ci. Je tenterai dans le futur d'analyser le patron d'expression des gènes régulés par l'activité glycinergique de façon à mieux comprendre la neurogénèse et sa régulation par la glycine.

Matériel et Méthodes

Animaux

Les poissons zébrés (*Danio rerio*) ont été élevés et accouplés selon les procédures standards (Westerfield et al 1999). Toutes les expériences ont été faites à l'Université de Montréal en accord avec le guide du conseil canadien des soins aux animaux. La lignée transgénique [*alx*:GFP] a gracieusement été offerte par Kimura et al. (2006). La lignée transgénique [*Isl*:GFP] a gracieusement été offerte par Okamoto et al. (2005). La lignée transgénique [*Ngn*:GFP] a gracieusement été offerte par Strähle et al. (2006). La lignée transgénique [*Plp*:GFP] a gracieusement été offerte par Yoshida et al. (2005). La lignée mutante [*Beo*] a gracieusement été offerte par Kuwada et al. (2005). La lignée transgénique [*Enx*:GFP] a été créée au laboratoire par Suster et al (2009).

Injections

Un morpholino bloquant la traduction a été injecté, à une concentration de 0.25mM, dans les embryons de une à huit cellules pour abaisser le niveau de la traduction (knock-down (KD)) du transcript du récepteur glycinergique embryonnaire. La séquence de celui-ci est la même que dans la publication de McDearmid et al : 5'TGATAATGAGAGAGAAATGCGTCA 3'. Des amorces, prenant en considération la nouvelle annotation du génome, ont été synthétisées et testé sur des poissons injectés avec le morpholino pour vérifier le knock-down. Ils ont été nommé new-gly4a-1+ : CTCCTCAGGTCATAAGGATT et new-gly4a-1- : ATTCCATTCTGAAAGATCCTC. Les résultats ont été concluants avec ces nouvelles amorces, tout comme auparavant avec les amorces utilisés par McDearmid. Pour les injections d'ARNm dans les expériences de surexpression, l'ARNm a été transcrit d'une construction de pCS2 linéarisé avec *KpnI* en utilisant la SP6 polymerase mMESSAGE mMACHINE kit (Ambion). L'ARNm a ensuite été dilué dans de l'eau sans nucléases (Ambion) avec 0.05% de Fast Green (Sigma) pour confirmer l'injection. L'injection de l'ARNm de KCC2 a été effectué à une concentration de 100 à 150 ng par 2-3 nl en utilisant un injecteur à pression Picospritzer III (General Valve, Fairfield, NJ). Le gène du poisson zébré *zfkcc2* (GenBank accession number

XM_001337764) a été identifié (National Center for Biotechnology Information) et utilisé pour faire le design d'amorces spécifiques: GAGATGCAACATCCAAGGAAAG, et CCGCGTAGATAGCCAGGATGG. L'ARN total du poisson zébré à différentes étapes de développement a été extrait en utilisant du Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). L'ADNc a été synthétisé avec la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Les PCR ont été effectués en utilisant la *Pfu* (Fermentas) et la *Taq* (Expand Long Template; Roche, Indianapolis, IN) pour insérer un site *EcoRI* en aval du codon de départ et un site *SalI* en aval de la séquence de 31 adenosines. Les amorces ont respectivement la séquence TTGAATTCACTCAACAACCTGACGGACTGC et GCGTCGACGCTTGCATGCCTTGCGGCCGC. Le produit PCR a été introduit dans un vecteur pCRII TOPO (Invitrogen), digéré avec *EcoRI* et *SalI*, et ensuite ligué dans le vecteur pEGFP-C1 en utilisant la T4 ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA). KCC2-EGFP a ensuite été digéré avec *SnaBI* et *SalI* pour être ligué dans le vecteur d'expression - pCS2_ zebrafish vector (fourni par D. Turner, University of Michigan, Ann Arbor, MI) pré-digéré avec *StuI* et *XhoI*. La construction a ensuite été digérée avec *ClaI* and *NheI* pour enlever une séquence en amont du codon de départ de *EGF*, a été traité avec la Klenow et recircularisé avec la T4.

Des embryons sauvages ont été injectés à 24 ou 48 heures post-fertilisation avec 80-100 μ M d'olomoucine pour ralentir le cycle cellulaire des progéniteurs (Calegari & Huttner 2003). La solution incluait 1% de fast-green pour visualisation de l'injection. Les embryons ont été déchorionés et plongés dans une solution de 10% low melting point agarose dans du tampon Evans. La solution a été injectée dans le cerveau ou le cœur en utilisant une fine électrode de verre. Les embryons ont ensuite été enlevés de l'agarose et élevés normalement à 28.5 degrés Celsius. Les poissons ayant un phénotype sévère non pas été retenues pour les immunohistochimie (<5%)

Application chronique de drogues

Les poissons sauvages ou transgéniques ont été placés dans un bain contenant 100 μ M de Strychnine dans du Evans dès 8 heures post fertilisations pendant une période de 40 heures. Les poissons ayant un phénotype sévère n'ont pas été retenus pour les immunohistochimies (<10%). De la même manière les embryons ont été placés dans une solution de Nifédipine à 25-50 μ M et 5% DMSO dans du tampon Evans, de 8 à 24 heures post fertilisation pour ensuite procéder à des immunohistochimies. Les poissons ayant un phénotype sévère non pas été retenues pour les immunohistochimie (<40%).

Immunohistochimie

Les embryons de 24, 48 ou 72 heures après fertilisations (hpf) ont été déchorionés et anesthésiés dans du 0,02 % tricaine (Sigma) dilué dans du milieu Evans au pH 7,8 (Saint-Amant & Drapeau 2000b). Ils ont par la suite été fixés dans du paraformaldehyde (PFA) 4% dilué dans du milieu PB pendant 2 heures à température pièce ou tout la nuit à 4°C. Le PFA fût lavé plusieurs fois dans du PBTx (PBS avec Triton X-100) et par la suite les embryons ont été perméabilisés dans de l'eau distillée pendant 30 min. Ils ont été par la suite incubé 1 heure minimum dans la solution de blocage (2% sérum de chèvre, 1% BSA, 1% DMSO, 0.1 % triton X-100 dans du PBS), et toute la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage avec agitation légère. Les anticorps primaires utilisés sont anti-Hu (1 :50 Molecular Probes), anti-tubuline-acétylé (1 :100 Sigma), anti-Pax2 (1 :100 Covance), anti-GFP (1 :100 Molecular Probes), anti-brdu (1 :50 Sigma), anti-GAD65/67 (Biomol 1 :100), anti-PH3 (Upstate 1 :100), anti En1 (Sigma 1 :50). Les embryons ont ensuite été lavés de façon extensive dans du PBTx et incubé toute la nuit dans l'anticorps secondaire anti-souris ou lapin conjugué Alexa488 ou Alexa568 (1 :1000 Molecular probes), dilué dans la solution de blocage. Après rinçage dans du PBTx, les embryons ont été transférés dans du glycérol 50% et montés sur une lamelle avec coverslip.

Pour marquer les cellules en prolifération, les embryons âgés de 24 ou 48 heures postfertilisation ont été déchorionés, anesthésiés dans du tricaine et injectés dans le sac vitellin avec une solution de 20mM de bromodeoxyuridine (BrdU) dilué dans du Evans ou immergés dans une solution de 10 mM BrdU et 15 % DMSO dans du Evans. Après 20 minutes sur glace, les embryons ont été lavés intensivement au PB et ont été incubés à 28.5°C jusqu'au développement désirés. Ils ont ensuite été fixé dans du 4% PFA pendant 3hrs et lavés intensivement dans du PB, puis placés dans du méthanol à -20 °C pendant une heure. Ils ont ensuite été réhydratés avec une succession de quatre dilutions de méthanol dans du PBS (75%, 50% 30%, 15%). Un lavage au PBTx puis un autre dans de l'eau ont par la suite été réalisés. Après deux rinçages au HCl, les embryons ont été incubés 30 minutes dans du 2N HCl. Plusieurs lavements au PBTx ont suivi cette incubation pour finalement utiliser le protocole d'immunohistochimie décrit auparavant avec l'anticorps primaire anti-BrdU pour détecter les cellules en prolifération.

Statistiques

Les phénotypes observés après injection d'ARN messenger *hkcc2*, de GlyR morpholino, ou de traitements à la strychnine, olomoucine, bicuculine ou nifedipine ont été comparés en utilisant une analyse chi². En utilisant les couches de 1µm de l'axe z, un décompte cellulaire en utilisant le logiciel imageJ sur 100µm longitudinal entre les sommités 15 et 17 sur toute l'épaisseur du poisson. Le décompte à été fait mécaniquement et comparé entre les sections en utilisant un test T de student.

Microscopie confocale

L'imagerie a été effectuée sur un système Quorum WaveFX spinning disc confocal (Quorum technologie Inc Ghelph, On, Canada) basé sur un Yokogawa CSU-10 head (Yokogawa Electric) modifié et monté sur un upright Olympus BX61WI microscope. L'acquisition des images a été faite sur le logiciel : Volocity software package (Improvision, Coventry, England).

Conclusion

Les résultats des expériences faites au cours des ces deux dernières années appuient de façon solide le modèle suggérant que certains neurotransmetteurs, ici la glycine, puissent moduler le développement du système nerveux et la neurogénèse. De façon évidente, la surexpression du cotransporteur de chlore KCC2 initialement absent chez les neurones immatures, a perturbé le développement de tous les sous-types d'interneurones en rendant la glycine hyperpolarisante dès les premières phases de développement. De plus, j'ai aussi ciblé le récepteur glycinergique directement en bloquant son activité et son expression à l'aide d'une drogue spécifique, la strychnine et d'un morpholino antisens. Dans les trois cas (KCC2, strychnine et GlyR KD), les perturbations de l'activité neuronale ont provoqué des erreurs dans la neurogenèse, plus spécifiquement une baisse de la population d'interneurones de façon globale. La signalisation médiée par l'interaction de la glycine à son récepteur embryonnaire semble donc être importante pour la sortie du cycle cellulaire des cellules progénitrices. De plus, la liaison de la glycine à son récepteur médiant une dépolarisation et provoquant l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule serait aussi hypothétiquement responsable de promouvoir la différenciation des interneurones. En soutiens à cette hypothèse, en bloquant les canaux calciques activés à bas voltage dans le développement avec la drogue nifedipine, il y a des erreurs dans la neurogénèse semblables à celles remarquées dans les trois conditions précédentes. Je suggère donc une implication du récepteur glycinergique dans les variations calciques intracellulaires des cellules progénitrices. Ces décharges calciques semblent indispensables au bon déroulement de la neurogénèse via des mécanismes encore inconnus.

Annexes

Tableau I. Statistiques de la Figure 5

Eng		ALX	
wt	9.5 ± 0.7 N=20	wt	27.3 ± 0.5 N=20
s100	5.2 ± 1.1 N=10	s100	16.7 ± 1.9 N=3
GlyR KD	7.0 ± 0.5 N=9	GlyR KD	16.4 ± 1.3 N=7
KCC2	6.5 ± 1.3 N=4	KCC2	17.8 ± 1.9 N=4
PAX2		GAD	
wt	53.6 ± 3.9 N=10	wt	35.2 ± 1.8 N=5
s100	31.5 ± 2.1 N=6	s100	18.0 ± 0.5 N=11
GlyR KD	31.5 ± 2.8 N=6	GlyR KD	27.8 ± 1.4 N=6
KCC2	30.8 ± 2.1 N=8	KCC2	21.9 ± 0.7 N=13
EVX			
wt	26.4 ± 1.4 N=22		
s100	15.4 ± 2.4 N=5		
GlyR KD	18.7 ± 1.9 N=3		
KCC2	14.8 ± 1.6 N=4		

Tableau II. Statistiques de la Figure 6 et de la Figure 10

ISL		NGN	
wt	15.3 ± 0.4 N=24	wt	33.6 ± 4.0 N=5
s100	15.1 ± 0.6 N=16	s100	29.4 ± 3.2 N=10
GlyR KD	15.7 ± 0.8 N=7	GlyR KD	33.0 ± 3.2 N=7
KCC2	14.8 ± 1.5 N=4	KCC2	31.3 ± 3.0 N=7
PLP			
wt	18.5 ± 1.4 N=8		
s100	17.3 ± 1.9 N=3		
GlyR KD	16.0 ± 1.5 N=3		
KCC2	17.0 ± 2.7 N=4		

Tableau III. Statistiques de la Figure 7

WT PH3	7.4 ± 1.3 N=7
KCC2 PH3	7.8 ± 1.2 N=5
WT HU	28.6 ± 2.7 N=5
KCC2 HU	16.4 ± 2.7 N=5

Tableau IV. Statistiques de la Figure 11

HU GlyR KD	
1d kd	25.4 ± 4.9 N=7
2d kd	29.0 ± 3.3 N=7
3d kd	46.4 ± 4.4 N=14
1d wt	22.3 ± 3.0 N=7
2d wt	63.2 ± 7.4 N=9
3d wt	102.3 ± 11.8 N=8
PH3 GlyR KD	
1d kd	8.7 ± 1.5 N=3
2d kd	12.3 ± 2.4 N=10
3d kd	8.4 ± 1.4 N=5
1d wt	18.0 ± 1.5 N=3
2d wt	8.0 ± 1.5 N=3
3d wt	3.7 ± 0.3 N=3

Tableau V. Statistiques de la Figure 12

Ctrl pax	53.6 ± 3.9 N=10
Bicuculine pax	54.8 ± 1.9 N=8
Beo pax	50.2 ± 6.0 N=11
Beo SIB pax	50.8 ± 5.4 N=11
Ctrl HU	63.2 ± 7.4 N=9
Bicuculine HU	63.4 ± 3.4 N=7
Beo HU	62.8 ± 5.7 N=5
Beo SIB HU	63.0 ± 5.4 N=6

Bibliographie

- Agrawal HC, Davison AN, Kaczmarek LK. 1971. Subcellular distribution of taurine and cysteinesulphinatase decarboxylase in developing rat brain. *Biochem J* 122:759-63
- Aguado F, Carmona MA, Pozas E, Aguilo A, Martinez-Guijarro FJ, et al. 2003. BDNF regulates spontaneous correlated activity at early developmental stages by increasing synaptogenesis and expression of the K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2. *Development* 130:1267-80
- Akerman CJ, Cline HT. 2006. Depolarizing GABAergic conductances regulate the balance of excitation to inhibition in the developing retinotectal circuit in vivo. *J Neurosci* 26:5117-30
- Albrieux M, Platel JC, Dupuis A, Brocard J, Savasta M, Villaz M. 2006. [Neuronal activity before synaptogenesis: Na⁺ channels, Ca²⁺ signalling and glutamatergic secretion or how to play the part when some famous actors are missing in the scene?]. *Med Sci (Paris)* 22:359-61
- Albright TD, Jessell TM, Kandel ER, Posner MI. 2000. Neural science: a century of progress and the mysteries that remain. *Cell* 100 Suppl:S1-55
- Alexandre P, Reugels AM, Barker D, Blanc E, Clarke JD. 2010. Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nat Neurosci* 13:673-9
- Ali DW, Drapeau P, Legendre P. 2000. Development of spontaneous glycinergic currents in the Mauthner neuron of the zebrafish embryo. *J Neurophysiol* 84:1726-36
- Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, et al. 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282:1711-4
- Andjus PR, Khiroug L, Yakel JL, Cherubini E, Nistri A. 1996. Changes in intracellular calcium induced by NMDA in cultured rat hippocampal neurons require exogenous glycine. *Neurosci Lett* 210:25-8
- Aprison MH, Shank RP, Davidoff RA. 1969. A comparison of the concentration of glycine, a transmitter suspect, in different areas of the brain and spinal cord in seven different vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 28:1345-55
- Arber S, Han B, Mendelsohn M, Smith M, Jessell TM, Sockanathan S. 1999. Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23:659-74

- Armstrong CM, Hille B. 1998. Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* 20:371-80
- Arthur JM, Lawrence MS, Payne CR, Rane MJ, McLeish KR. 2000. The calcium-sensing receptor stimulates JNK in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* 275:538-41
- Ashworth R, Bolsover SR. 2002a. Spontaneous activity-independent intracellular calcium signals in the developing spinal cord of the zebrafish embryo. *Dev Brain Res* 139:131-7
- Ashworth R, Bolsover SR. 2002b. Spontaneous activity-independent intracellular calcium signals in the developing spinal cord of the zebrafish embryo. *Brain Res Dev Brain Res* 139:131-7
- Aza-Blanc P, Ramirez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg TB. 1997. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* 89:1043-53
- Basak O, Taylor V. 2007. Identification of self-replicating multipotent progenitors in the embryonic nervous system by high Notch activity and Hes5 expression. *Eur J Neurosci* 25:1006-22
- Batista MF, Jacobstein J, Lewis KE. 2008. Zebrafish V2 cells develop into excitatory CiD and Notch signalling dependent inhibitory VeLD interneurons. *Dev Biol* 322:263-75
- Belachew S, Malgrange B, Rigo JM, Rogister B, Coucke P, et al. 1998. Developmental regulation of neuroligand-induced responses in cultured oligodendroglia. *Neuroreport* 9:973-80
- Belachew S, Malgrange B, Rigo JM, Rogister B, Leprince P, et al. 2000. Glycine triggers an intracellular calcium influx in oligodendrocyte progenitor cells which is mediated by the activation of both the ionotropic glycine receptor and Na⁺-dependent transporters. *Eur J Neurosci* 12:1924-30
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-39
- Benardete EA, Kriegstein AR. 2002. Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia* 43:970-82
- Bernhardt RR, Chitnis AB, Lindamer L, Kuwada JY. 1990. Identification of spinal neurons in the embryonic and larval zebrafish. *J Comp Neurol* 302:603-16

- Blader P, Plessy C, Strahle U. 2003. Multiple regulatory elements with spatially and temporally distinct activities control neurogenin1 expression in primary neurons of the zebrafish embryo. *Mech Dev* 120:211-8
- Boettger T, Hubner CA, Maier H, Rust MB, Beck FX, Jentsch TJ. 2002. Deafness and renal tubular acidosis in mice lacking the K-Cl co-transporter Kcc4. *Nature* 416:874-8
- Bormann J, Rundstrom N, Betz H, Langosch D. 1993. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* 12:3729-37
- Bortone D, Polleux F. 2009. KCC2 expression promotes the termination of cortical interneuron migration in a voltage-sensitive calcium-dependent manner. *Neuron* 62:53-71
- Brent LJ, Drapeau P. 2002. Targeted "knockdown" of channel expression in vivo with an antisense morpholino oligonucleotide. *Neuroscience* 114:275-8
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435-45
- Brnjic S, Olofsson MH, Havelka AM, Linder S. 2010. Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis. *Mol Biosyst* 6:767-74
- Brustein E, Marandi N, Kovalchuk Y, Drapeau P, Konnerth A. 2003. "In vivo" monitoring of neuronal network activity in zebrafish by two-photon Ca(2+) imaging. *Pflugers Arch* 446:766-73
- Burrill JD, Moran L, Goulding MD, Saueressig H. 1997. PAX2 is expressed in multiple spinal cord interneurons, including a population of EN1+ interneurons that require PAX6 for their development. *Development* 124:4493-503
- Buss RR, Drapeau P. 2001. Synaptic drive to motoneurons during fictive swimming in the developing zebrafish. *J Neurophysiol* 86:197-210
- Calegari F, Huttner WB. 2003. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci* 116:4947-55
- Cancedda L, Fiumelli H, Chen K, Poo MM. 2007. Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* 27:5224-35

- Carmona MA, Pozas E, Martinez A, Espinosa-Parrilla JF, Soriano E, Aguado F. 2006. Age-dependent spontaneous hyperexcitability and impairment of GABAergic function in the hippocampus of mice lacking *trkB*. *Cereb Cortex* 16:47-63
- Chen W, Burgess S, Hopkins N. 2001. Analysis of the zebrafish smoothened mutant reveals conserved and divergent functions of hedgehog activity. *Development* 128:2385-96
- Cheng CW, Yan CH, Hui CC, Strahle U, Cheng SH. 2006. The homeobox gene *irx1a* is required for the propagation of the neurogenic waves in the zebrafish retina. *Mech Dev* 123:252-63
- Chu-Lagraff Q, Wright DM, McNeil LK, Doe CQ. 1991. The prospero gene encodes a divergent homeodomain protein that controls neuronal identity in *Drosophila*. *Development Suppl* 2:79-85
- Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hubner CA, Pellegrino C, et al. 2005. Early expression of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expression of functional GABA synapses. *J Physiol* 566:671-9
- Cicirata F, Meli C, Castorina C, Serapide MF, Sorrenti V, et al. 1991. Neurotransmitter amino acid levels in rat thalamus and cerebral cortex after cerebellectomy. *Int J Dev Neurosci* 9:365-9
- Connors BW, Malenka RC, Silva LR. 1988. Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABAA and GABAB receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *J Physiol* 406:443-68
- Costa B, Giusti L, Martini C, Lucacchini A. 1996. Characterization of a voltage-dependent L-type calcium channel from rabbit and turtle brain. *Neurochem Res* 21:537-40
- Delpire E, Mount DB. 2002. Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annu Rev Physiol* 64:803-43
- Deng L, Yao J, Fang C, Dong N, Luscher B, Chen G. 2007. Sequential postsynaptic maturation governs the temporal order of GABAergic and glutamatergic synaptogenesis in rat embryonic cultures. *J Neurosci* 27:10860-9
- Devau G. 2000. Glycine induced calcium concentration changes in vestibular type I sensory cells. *Hear Res* 140:126-36
- Drapeau P, Saint-Amant L, Buss RR, Chong M, McDearmid JR, Brustein E. 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Prog Neurobiol* 68:85-111
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, et al. 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205-13

- Ekker M, Wegner J, Akimenko MA, Westerfield M. 1992. Coordinate embryonic expression of three zebrafish engrailed genes. *Development* 116:1001-10
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, et al. 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-80
- Feller MB. 1999. Spontaneous correlated activity in developing neural circuits. *Neuron* 22:653-6
- Feng G, Tintrop H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, et al. 1998. Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282:1321-4
- Fiumelli H, Cancedda L, Poo MM. 2005. Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca²⁺-dependent regulation of KCC2 function. *Neuron* 48:773-86
- Fiumelli H, Woodin MA. 2007. Role of activity-dependent regulation of neuronal chloride homeostasis in development. *Curr Opin Neurobiol* 17:81-6
- Fjose A, Eiken HG, Njolstad PR, Molven A, Hordvik I. 1988. A zebrafish engrailed-like homeobox sequence expressed during embryogenesis. *FEBS Lett* 231:355-60
- Flint AC, Liu X, Kriegstein AR. 1998. Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development. *Neuron* 20:43-53
- Frech MJ, Deitmer JW, Backus KH. 1999. Intracellular chloride and calcium transients evoked by gamma-aminobutyric acid and glycine in neurons of the rat inferior colliculus. *J Neurobiol* 40:386-96
- Fucile S, De Saint Jan D, de Carvalho LP, Bregestovski P. 2000. Fast potentiation of glycine receptor channels of intracellular calcium in neurons and transfected cells. *Neuron* 28:571-83
- Furuya S, Tabata T, Mitoma J, Yamada K, Yamasaki M, et al. 2000. L-serine and glycine serve as major astroglia-derived trophic factors for cerebellar Purkinje neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11528-33
- Gage FH. 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-8
- Gaiano N, Nye JS, Fishell G. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* 26:395-404

- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. 2001. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* 105:521-32
- Gillen CM, Brill S, Payne JA, Forbush B, 3rd. 1996. Molecular cloning and functional expression of the K-Cl cotransporter from rabbit, rat, and human. A new member of the cation-chloride cotransporter family. *J Biol Chem* 271:16237-44
- Gotz M, Huttner WB. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-88
- Graba Y, Aragnol D, Pradel J. 1997. Drosophila Hox complex downstream targets and the function of homeotic genes. *Bioessays* 19:379-88
- Grillner S. 2003. The motor infrastructure: from ion channels to neuronal networks. *Nat Rev Neurosci* 4:573-86
- Guner B, Karlstrom RO. 2007. Cloning of zebrafish nkx6.2 and a comprehensive analysis of the conserved transcriptional response to Hedgehog/Gli signaling in the zebrafish neural tube. *Gene Expr Patterns* 7:596-605
- Haffter P, Nusslein-Volhard C. 1996. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol* 40:221-7
- Hale ME, Ritter DA, Fetcho JR. 2001. A confocal study of spinal interneurons in living larval zebrafish. *J Comp Neurol* 437:1-16
- Hammerschmidt M, Serbedzija GN, McMahon AP. 1996. Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes Dev* 10:2452-61
- Hans S, Scheer N, Riedl I, v Weizsacker E, Blader P, Campos-Ortega JA. 2004. her3, a zebrafish member of the hairy-E(spl) family, is repressed by Notch signalling. *Development* 131:2957-69
- Hatta K, Ankri N, Faber DS, Korn H. 2001. Slow inhibitory potentials in the teleost Mauthner cell. *Neuroscience* 103:561-79
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P. 2000. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-74
- Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, et al. 1999. Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem* 274:10661-7

- Hinckley C, Seebach B, Ziskind-Conhaim L. 2005. Distinct roles of glycinergic and GABAergic inhibition in coordinating locomotor-like rhythms in the neonatal mouse spinal cord. *Neuroscience* 131:745-58
- Hirata H, Carta E, Yamanaka I, Harvey RJ, Kuwada JY. 2009. Defective glycinergic synaptic transmission in zebrafish motility mutants. *Front Mol Neurosci* 2:26
- Hirata H, Saint-Amant L, Downes GB, Cui WW, Zhou W, et al. 2005. Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8345-50
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, et al. 2002. Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev* 16:846-58
- Huang L, Li L. 2006. Differential expression of voltage-activated calcium currents in zebrafish retinal ganglion cells. *J Neurosci Res* 84:497-504
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, et al. 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866-73
- Hubner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K, Jentsch TJ. 2001. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30:515-24
- Ikeda M, Toyoda H, Yamada J, Okabe A, Sato K, et al. 2003. Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl⁻ homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 984:149-59
- Imboden M, De Saint Jan D, Leulier F, Korn H, Goblet C, Bregestovski P. 2001. Isolation and characterization of an alpha 2-type zebrafish glycine receptor subunit. *Neuroscience* 103:799-810
- Inanami O, Ohta T, Ito S, Kuwabara M. 1999. Elevation of intracellular calcium ions is essential for the H₂O₂-induced activation of SAPK/JNK but not for that of p38 and ERK in Chinese hamster V79 cells. *Antioxid Redox Signal* 1:501-8
- Ishitani T, Hirao T, Suzuki M, Isoda M, Ishitani S, et al. 2010. Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nat Cell Biol* 12:278-85
- Ito S, Cherubini E. 1991. Strychnine-sensitive glycine responses of neonatal rat hippocampal neurones. *J Physiol* 440:67-83

- Jessell TM. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-9
- Kandler K, Katz LC. 1998. Coordination of neuronal activity in developing visual cortex by gap junction-mediated biochemical communication. *J Neurosci* 18:1419-27
- Karadsheh MF, Delpire E. 2001. Neuronal restrictive silencing element is found in the KCC2 gene: molecular basis for KCC2-specific expression in neurons. *J Neurophysiol* 85:995-7
- Katz LC. 1993. Coordinate activity in retinal and cortical development. *Curr Opin Neurobiol* 3:93-9
- Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB. 2006. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci* 26:12152-64
- Kiehn O, Quinlan KA, Restrepo CE, Lundfald L, Borgius L, et al. 2008. Excitatory components of the mammalian locomotor CPG. *Brain Res Rev* 57:56-63
- Kim CH, Ueshima E, Muraoka O, Tanaka H, Yeo SY, et al. 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett* 216:109-12
- Kim H, Shin J, Kim S, Poling J, Park HC, Appel B. 2008. Notch-regulated oligodendrocyte specification from radial glia in the spinal cord of zebrafish embryos. *Dev Dyn* 237:2081-9
- Kimmel CB, Patterson J, Kimmel RO. 1974. The development and behavioral characteristics of the startle response in the zebra fish. *Dev Psychobiol* 7:47-60
- Kimura Y, Okamura Y, Higashijima S. 2006. alx, a zebrafish homolog of Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spinal locomotor circuits. *J Neurosci* 26:5684-97
- Kneussel M, Betz H. 2000. Clustering of inhibitory neurotransmitter receptors at developing postsynaptic sites: the membrane activation model. *Trends Neurosci* 23:429-35
- Kotak VC, Sanes DH. 1996. Developmental influence of glycinergic transmission: regulation of NMDA receptor-mediated EPSPs. *J Neurosci* 16:1836-43
- Krnjevic K, Schwartz S. 1967. The action of gamma-aminobutyric acid on cortical neurones. *Exp Brain Res* 3:320-36
- Kuhse J, Schmieden V, Betz H. 1990. Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 265:22317-20

- Langosch D, Thomas L, Betz H. 1988. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7394-8
- Latasa MJ, Cisneros E, Frade JM. 2009. Cell cycle control of Notch signaling and the functional regionalization of the neuroepithelium during vertebrate neurogenesis. *Int J Dev Biol* 53:895-908
- Laube B, Langosch D, Betz H, Schmieden V. 1995. Hyperekplexia mutations of the glycine receptor unmask the inhibitory subsite for beta-amino-acids. *Neuroreport* 6:897-900
- Le Novère N, Changeux JP. 1999. The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res* 27:340-2
- Leclerc C, Daguzan C, Nicolas MT, Chabret C, Duprat AM, Moreau M. 1997. L-type calcium channel activation controls the in vivo transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mech Dev* 64:105-10
- Leclerc C, Neant I, Webb SE, Miller AL, Moreau M. 2006. Calcium transients and calcium signalling during early neurogenesis in the amphibian embryo *Xenopus laevis*. *Biochim Biophys Acta* 1763:1184-91
- Lee H, Chen CX, Liu YJ, Aizenman E, Kandler K. 2005. KCC2 expression in immature rat cortical neurons is sufficient to switch the polarity of GABA responses. *Eur J Neurosci* 21:2593-9
- Lee KJ, Dietrich P, Jessell TM. 2000. Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403:734-40
- Lees E. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 7:773-80
- Legendre P, Korn H. 1994. Glycinergic inhibitory synaptic currents and related receptor channels in the zebrafish brain. *Eur J Neurosci* 6:1544-57
- Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y, Bregestovski P. 1995. Synaptic GABAA activation induces Ca^{2+} rise in pyramidal cells and interneurons from rat neonatal hippocampal slices. *J Physiol* 487 (Pt 2):319-29
- Li H, Khirug S, Cai C, Ludwig A, Blaesse P, et al. 2007. KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* 56:1019-33
- Liu DZ, Ander BP, Sharp FR. 2010. Cell cycle inhibition without disruption of neurogenesis is a strategy for treatment of central nervous system diseases. *Neurobiol Dis* 37:549-57

- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8:1179-87
- Lobjois V, Bel-Vialar S, Trousse F, Pituello F. 2008. Forcing neural progenitor cells to cycle is insufficient to alter cell-fate decision and timing of neuronal differentiation in the spinal cord. *Neural Development* 3:-
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. 1995. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-98
- Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C. 2003. Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci* 18:3199-206
- Lupo G, Harris WA, Lewis KE. 2006. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7:103-14
- Ma F, Yang F, Kaneko A, Manabe A, Tanaka R, et al. 2000. Cytokine requirement for the development of T-lymphoid lineage potential in clonal lymphohaematopoietic progenitors in vitro. *Br J Haematol* 111:1170-9
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. 1991. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10:2401-9
- Manent JB, Demarque M, Jorquera I, Pellegrino C, Ben-Ari Y, et al. 2005. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *J Neurosci* 25:4755-65
- Mantel C, Luo Z, Canfield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE. 1996. Involvement of p21cip-1 and p27kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 88:3710-9
- Marchioro M, Swanson KL, Aracava Y, Albuquerque EX. 1996. Glycine and calcium-dependent effects of lead on N-methyl-D-aspartate receptor function in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 279:143-53
- Maric D, Maric I, Chang YH, Barker JL. 2000. Stereotypical physiological properties emerge during early neuronal and glial lineage development in the embryonic rat neocortex. *Cereb Cortex* 10:729-47
- Mason HA, Rakowiecki SM, Raftopoulou M, Nery S, Huang Y, et al. 2005. Notch signaling coordinates the patterning of striatal compartments. *Development* 132:4247-58

- McDermid JR, Liao M, Drapeau P. 2006. Glycine receptors regulate interneuron differentiation during spinal network development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9679-84
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. 1995. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15:563-72
- Mielke K. 2008. Growth-arrest-dependent expression and phosphorylation of p27kip at serine10 is mediated by the JNK pathway in C6 glioma cells. *Mol Cell Neurosci* 38:301-11
- Mikawa S, Wang C, Shu F, Wang T, Fukuda A, Sato K. 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2 and NKCC1 mRNAs in the rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 136:93-100
- Miranda-Contreras L, Benitez-Diaz PR, Mendoza-Briceno RV, Delgado-Saez MC, Palacios-Pru EL. 1999. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures. *Dev Neurosci* 21:147-58
- Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceno RV, Palacios-Pru EL. 1998. Levels of monoamine and amino acid neurotransmitters in the developing male mouse hypothalamus and in histotypic hypothalamic cultures. *Int J Dev Neurosci* 16:403-12
- Miranda-Contreras L, Ramirez-Martens LM, Benitez-Diaz PR, Pena-Contreras ZC, Mendoza-Briceno RV, Palacios-Pru EL. 2000. Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures. *Int J Dev Neurosci* 18:83-91
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, et al. 2001. Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31:757-71
- Mizutani K, Saito T. 2005. Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 132:1295-304
- Moran-Rivard L, Kagawa T, Saueressig H, Gross MK, Burrill J, Goulding M. 2001. Evx1 is a postmitotic determinant of v0 interneuron identity in the spinal cord. *Neuron* 29:385-99
- Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Jr., et al. 1999. Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem* 274:16355-62

- Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, Belachew S, Malgrange B, et al. 2001. Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 305:187-202
- Ninkovic J, Tallafuss A, Leucht C, Topczewski J, Tannhauser B, et al. 2005. Inhibition of neurogenesis at the zebrafish midbrain-hindbrain boundary by the combined and dose-dependent activity of a new hairy/E(spl) gene pair. *Development* 132:75-88
- O'Donovan MJ. 1999. The origin of spontaneous activity in developing networks of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 9:94-104
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Kriegstein AR. 1996. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *J Neurosci* 16:6414-23
- Owens DF, Kriegstein AR. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3:715-27
- Palackal T, Moretz R, Wisniewski H, Sturman J. 1986. Abnormal visual cortex development in the kitten associated with maternal dietary taurine deprivation. *J Neurosci Res* 15:223-39
- Palma V, Kukuljan M, Mayor R. 2001. Calcium mediates dorsoventral patterning of mesoderm in *Xenopus*. *Curr Biol* 11:1606-10
- Pasini A, Jiang YJ, Wilkinson DG. 2004. Two zebrafish Notch-dependent hairy/Enhancer-of-split-related genes, *her6* and *her4*, are required to maintain the coordination of cyclic gene expression in the presomitic mesoderm. *Development* 131:1529-41
- Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 26:199-206
- Pflieger JF, Dubuc R. 2000. Relationship between vestibular primary afferents and vestibulospinal neurons in lampreys. *J Comp Neurol* 427:255-73
- Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C, Jessell TM. 1999. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97:903-15
- Plotkin MD, Kaplan MR, Peterson LN, Gullans SR, Hebert SC, Delpire E. 1997. Expression of the Na(+)-K(+)-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol* 272:C173-83
- Price TJ, Cervero F, de Koninck Y. 2005. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem* 5:547-55

- Race JE, Makhoul FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ. 1999. Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-Cl cotransporter. *Am J Physiol* 277:C1210-9
- Reichling DB, Kyrozis A, Wang J, MacDermott AB. 1994. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transients in rat dorsal horn neurons. *J Physiol* 476:411-21
- Represa A, Ben-Ari Y. 2005. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28:278-83
- Reyes R, Haendel M, Grant D, Melancon E, Eisen JS. 2004. Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death. *Dev Dyn* 229:30-41
- Reynolds A, Brustein E, Liao M, Mercado A, Babilonia E, et al. 2008a. Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J Neurosci* 28:1588-97
- Reynolds A, Brustein E, Liao M, Mercado A, Babilonia E, et al. 2008b. Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J Neurosci* 28:1588-97
- Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, et al. 2002. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J Cell Biol* 159:747-52
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, et al. 1999. The K⁺/Cl⁻ cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397:251-5
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, et al. 2004. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683-91
- Ruiz i Altaba A, Nguyen V, Palma V. 2003. The emergent design of the neural tube: prepattern, SHH morphogen and GLI code. *Curr Opin Genet Dev* 13:513-21
- Rusconi JC, Corbin V. 1999. A widespread and early requirement for a novel Notch function during Drosophila embryogenesis. *Dev Biol* 215:388-98
- Saha MS, Miles RR, Grainger RM. 1997. Dorsal-ventral patterning during neural induction in Xenopus: assessment of spinal cord regionalization with xHB9, a marker for the motor neuron region. *Dev Biol* 187:209-23
- Saint-Amant L, Drapeau P. 2000a. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J Neurosci* 20:3964-72

- Saint-Amant L, Drapeau P. 2000b. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J Neurosci* 20:3964-72
- Sanes DH, Chokshi P. 1992. Glycinergic transmission influences the development of dendrite shape. *Neuroreport* 3:323-6
- Sanes DH, Hafidi A. 1996. Glycinergic transmission regulates dendrite size in organotypic culture. *J Neurobiol* 31:503-11
- Sanhueza D, Montoya A, Sierralta J, Kukuljan M. 2009. Expression of voltage-activated calcium channels in the early zebrafish embryo. *Zygote* 17:131-5
- Schmieden V, Kuhse J, Betz H. 1992. Agonist pharmacology of neonatal and adult glycine receptor alpha subunits: identification of amino acid residues involved in taurine activation. *EMBO J* 11:2025-32
- Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ. 1996. Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9881-6
- Shin J, Poling J, Park HC, Appel B. 2007. Notch signaling regulates neural precursor allocation and binary neuronal fate decisions in zebrafish. *Development* 134:1911-20
- Shirasaki R, Pfaff SL. 2002. Transcriptional codes and the control of neuronal identity. *Annu Rev Neurosci* 25:251-81
- Song L, Mercado A, Vazquez N, Xie Q, Desai R, et al. 2002. Molecular, functional, and genomic characterization of human KCC2, the neuronal K-Cl cotransporter. *Brain Res Mol Brain Res* 103:91-105
- Spana EP, Doe CQ. 1996. Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17:21-6
- Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Jentsch TJ, Hubner CA. 2004. Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride. *J Comp Neurol* 468:57-64
- Suster ML, Kania A, Liao M, Asakawa K, Charron F, et al. 2009. A novel conserved evx1 enhancer links spinal interneuron morphology and cis-regulation from fish to mammals. *Dev Biol* 325:422-33
- Takahashi K, Inanami O, Kuwabara M. 1999. Effects of intracellular calcium chelator BAPTA-AM on radiation-induced apoptosis regulated by activation of SAPK/JNK and caspase-3 in MOLT-4 cells. *Int J Radiat Biol* 75:1099-105

- Tan M, Hu X, Qi Y, Park J, Cai J, Qiu M. 2006. Gli3 mutation rescues the generation, but not the differentiation, of oligodendrocytes in Shh mutants. *Brain Res* 1067:158-63
- Tapia JC, Aguayo LG. 1998. Changes in the properties of developing glycine receptors in cultured mouse spinal neurons. *Synapse* 28:185-94
- Tapia JC, Cardenas AM, Nualart F, Mentis GZ, Navarrete R, Aguayo LG. 2000. Neurite outgrowth in developing mouse spinal cord neurons is modulated by glycine receptors. *Neuroreport* 11:3007-10
- Tfelt-Hansen J, MacLeod RJ, Chattopadhyay N, Yano S, Quinn S, et al. 2003. Calcium-sensing receptor stimulates PTHrP release by pathways dependent on PKC, p38 MAPK, JNK, and ERK1/2 in H-500 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E329-37
- Titze S, Hans M, Kelsch W, Lewen A, Swandulla D, Misgeld U. 2003. Hyperpolarizing inhibition develops without trophic support by GABA in cultured rat midbrain neurons. *J Physiol* 550:719-30
- Tohier C, Roze JC, David A, Veccierini MF, Renaud P, Mouzard A. 1991. Hyperexplexia or stiff baby syndrome. *Arch Dis Child* 66:460-1
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47:803-15
- Triller A, Rostaing P, Korn H, Legendre P. 1997. Morphofunctional evidence for mature synaptic contacts on the Mauthner cell of 52-hour-old zebrafish larvae. *Neuroscience* 80:133-45
- Tsang TE, Shawlot W, Kinder SJ, Kobayashi A, Kwan KM, et al. 2000. Lim1 activity is required for intermediate mesoderm differentiation in the mouse embryo. *Dev Biol* 223:77-90
- Tsuchida T, Ensini M, Morton SB, Baldassare M, Edlund T, et al. 1994. Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79:957-70
- Uemura O, Okada Y, Ando H, Guedj M, Higashijima S, et al. 2005. Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *Isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression. *Dev Biol* 278:587-606
- Vinay L, Jean-Xavier C. 2008. Plasticity of spinal cord locomotor networks and contribution of cation-chloride cotransporters. *Brain Res Rev* 57:103-10

- Wang C, Shimizu-Okabe C, Watanabe K, Okabe A, Matsuzaki H, et al. 2002. Developmental changes in KCC1, KCC2, and NKCC1 mRNA expressions in the rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 139:59-66
- Wang DS, Buckinx R, Lecorronc H, Mangin JM, Rigo JM, Legendre P. 2007. Mechanisms for picrotoxinin and picrotin blocks of $\alpha 2$ homomeric glycine receptors. *J Biol Chem* 282:16016-35
- Weaver CD, Partridge JG, Yao TL, Moates JM, Magnuson MA, Verdoorn TA. 1998. Activation of glycine and glutamate receptors increases intracellular calcium in cells derived from the endocrine pancreas. *Mol Pharmacol* 54:639-46
- Webb SE, Moreau M, Leclerc C, Miller AL. 2005. Calcium transients and neural induction in vertebrates. *Cell Calcium* 37:375-85
- Westerfield M, Doerry E, Douglas S. 1999. Zebrafish in the Net. *Trends Genet* 15:248-9
- Wilson SI, Graziano E, Harland R, Jessell TM, Edlund T. 2000. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Curr Biol* 10:421-9
- Withers MD, St John PA. 1997. Embryonic rat spinal cord neurons change expression of glycine receptor subtypes during development in vitro. *J Neurobiol* 32:579-92
- Woo NS, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, et al. 2002. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12:258-68
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. 2004. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J Physiol* 557:829-41
- Yoon K, Gaiano N. 2005. Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709-15
- Yoshida M, Macklin WB. 2005. Oligodendrocyte development and myelination in GFP-transgenic zebrafish. *J Neurosci Res* 81:1-8
- Young TL, Cepko CL. 2004. A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron* 41:867-79
- Zhou W, Horststick EJ, Hirata H, Kuwada JY. 2008. Identification and expression of voltage-gated calcium channel β subunits in Zebrafish. *Dev Dyn* 237:3842-52

